**INIBIDOR DE TRIPSINA EM *Eucalyptus urophylla* E SEU EFEITO
SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *in vitro* DE *Pisolithus
tinctorius* E *Rhizoctonia solani***

CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Engenheiro Agrônomo

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

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 2001

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

Tremacoldi, Célia Regina

Inibidor de tripsina em *Eucalyptus urophylla* e seu efeito sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Pisolithus tinctorius* e *Rhizoctonia solani* / Célia Regina Tremacoldi. - - Piracicaba, 2001.

83 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Enzima proteolítica 2. Eucalipto 3. Fungo micorrízico 4. Inibidor protease 5.
Queima-da-saia 6. Tripsina I. Título

CDD 634.9734

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati, pela valiosa orientação e pela generosa amizade.

Ao professor Dr. Tasso Leo Krugner, pela amizade sempre presente.

Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, na figura de todos os seus docentes e funcionários, agradeço a atenção, a boa vontade e a amizade recebidas durante a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Florestais - IPEF - pelo fornecimento das sementes de eucalipto.

À CAPES - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão de bolsa de estudo.

Ao colega de laboratório, doutorando Nelson Arno Wulff, pelas valiosas sugestões durante as análises de proteínas.

Aos queridos companheiros do laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, agradeço a amizade, as sugestões e o carinho com que sempre fui tratada. Vocês estarão eternamente em minha lembrança.

Agradecimentos especiais, também, à minha família, especialmente à minha mãe Célia e ao meu filho Pedro que tão generosamente sempre me apoiaram e confortaram no decorrer deste trabalho.

À Vida, minha gratidão pela oportunidade de realizar mais um trabalho capaz de me proporcionar tantos ensinamentos e tantas alegrias e realizações. Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Interações entre plantas e microrganismos - simbiose e parasitismo	3
2.2 Micorrizas	4
2.2.1 A associação ectomicorrízica	5
2.2.2 Compatibilidade e especificidade em ectomicorrizas	7
2.3 Principais patógenos relacionados a espécies de eucalipto	10
2.4 Bioquímica das interações patogênicas e simbióticas	10
2.4.1 Supressão de defesa das plantas com micorrizas	14
2.5 Proteases e inibidores de proteases nas interações planta-microrganismos	15
2.5.1 Papel biológico dos inibidores de proteases	18
2.5.1.1 Reserva protéica	18
2.5.1.2 Controle de enzimas endógenas	18
2.5.1.3 Defesa contra insetos	19
2.5.1.4 Defesa contra patógenos	20
2.6 Considerações finais	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Atividade de inibidores de proteases em sementes de <i>E. urophylla</i>	24
3.1.1 Obtenção do extrato protéico	25
3.1.1.1 Efeito de lectinas no extrato protéico	25
3.1.2 Teste para a atividade de inibidor de tripsina	25
3.1.3 Teste para a atividade de inibidor de quimotripsina	26

3.1.4 Teste para a atividade de inibidor de papaína	26
3.2 Efeito do extrato protéico bruto de sementes sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>P. tinctorius</i> e de <i>R. solani</i>	26
3.3 Atividade de inibidor de tripsina em raízes de <i>E. urophylla</i>	27
3.3.1 Obtenção das raízes a partir de plântulas	27
3.3.2 Obtenção do extrato protéico de raízes	28
3.3.3 Teste para atividade de inibidor de tripsina	29
3.4 Atividade de inibidor de tripsina em folhas de <i>E. urophylla</i>	30
3.4.1 Obtenção do extrato protéico de folhas	30
3.4.2 Teste para atividade de tripsina em folhas	34
3.5 Purificação parcial dos extratos de sementes, raízes e folhas por cromatografia líquida de exclusão molecular	34
3.5.1 Atividade de inibidor de tripsina nas frações	34
3.6 Determinação da atividade de tripsina e de inibidor de tripsina em filtrado de meio de cultivo de <i>P. tinctorius</i> e de <i>R. solani</i>	35
3.6.1 Obtenção dos filtrados fúngicos	35
3.6.2 Purificação parcial dos filtrados fúngicos por cromatografia líquida de exclusão molecular e teste para a atividade de tripsina	36
3.7 Cálculo das massas moleculares das frações com atividade inibitória	36
3.8 Efeito de frações do extrato de sementes, com atividade de inibidor de tripsina, sobre o crescimento <i>in vitro</i> dos isolados de <i>P. tinctorius</i> e de <i>R. solani</i>	37
3.9 Cálculo da concentração de proteínas nos extratos brutos e nas frações	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Atividade de inibidores de proteases no extrato bruto de sementes	39
4.2 Efeito do extrato bruto de sementes sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>P. tinctorius</i> e de <i>R. solani</i>	40
4.3 Atividade de inibidor de tripsina no extrato bruto de raízes	46

4.4 Atividade de inibidor de tripsina presente em frações de proteínas de sementes, raízes e folhas obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular	47
4.5 Atividade de tripsina e de inibidor de tripsina em filtrados de meio de cultivo dos isolados de <i>P. tinctorius</i> e de <i>R. solani</i>	48
4.6 Efeito de frações do extrato de sementes, com atividade inibitória de tripsina, sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de isolados de <i>P. tinctorius</i> e de <i>R. solani</i>	51
4.7 Massas moleculares das frações de sementes, raízes e folhas obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular	58
5 CONCLUSÕES	59
ANEXOS	60
Anexo A	61
Anexo B	62
Anexo C	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICES	81
Apêndice 1	82
Apêndice 2	83

LISTA DE FIGURAS

Página

1	Representação esquemática das estruturas de uma ectomicorriza. cm: cordão micelial; rH: rede de Hartig; m: manto. Adaptado de Beyrle, 1995 .	6
2	Fatores de natureza protéica possivelmente envolvidos na interação entre fungos ectomicorrízicos e a planta hospedeira	23
3	Sistema de produção de plântulas de <i>Eucalyptus urophylla</i> no interior de tubos de ensaio contendo solução de Sarruge 50% e 0,25% de ágar, mantidos a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h. Plântulas com 45 dias após o transplante.....	31
4	Detalhe de uma plântula de <i>Eucalyptus urophylla</i> com 45 dias após o transplante, cultivada em tubo de ensaio contendo solução de Sarruge 50% e 0,25% de ágar, mantido a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h.....	32
5	Detalhe das raízes de uma plântula de <i>Eucalyptus urophylla</i> , 45 dias após o transplante, produzida em tubo de ensaio com solução de Sarruge 50% e 0,25% de ágar, mantido a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h.....	33
6	Inibição das atividades de tripsina (A) e papaína (B) pelo extrato protéico bruto de sementes de <i>Eucalyptus urophylla</i> . Hidrólise de BAPNA 1mM por tripsina bovina (10 mg) e papaína (10 mg), em pH 8,0 a 37 °C, em presença de concentrações crescentes do extrato.....	41

- 7 Efeito de diferentes concentrações de proteína do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* sobre o crescimento micelial *in vitro* do isolado 1604 (compatível) de *Pisolithus tinctorius*, durante 12 dias de incubação **(A)**, e do isolado 185 (incompatível), durante 9 dias de incubação **(B)**, em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=21 µg; ▲=47 µg. As barras representam as médias ± erro padrão 42

- 8 Efeito de diferentes concentrações de proteína do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, durante 3 dias de incubação, em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=21 µg; ▲=47 µg. As barras representam as médias ± erro padrão..... 43

- 9 Aspecto das colônias do isolado 1604 (compatível - **A**) de *Pisolithus tinctorius* e do isolado 185 (incompatível - **B**), após 9 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (placas da esquerda) ou na presença de extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* equivalente a 21 e 47 µg de proteína/placa..... 44

- 10 Aspecto das colônias de *Rhizoctonia solani*, após 3 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (placa da esquerda) ou na presença de extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* equivalente a 21 e 47 µg de proteína/placa..... 45

- 11 Inibição da atividade de tripsina pelo extrato protéico bruto de raízes de *Eucalyptus urophylla*. Hidrólise de BAPNA 1mM por tripsina bovina (10 mg), em pH 8,0 a 37 °C, em presença de doses crescentes do extrato 47

- 12 Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR) do extrato protéico bruto de sementes **(A)**, raízes **(B)** e folhas **(C)** de *Eucalyptus urophylla*. A coluna cromatográfica (60 x 1,5 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo de 18 mL/h e 50 µL dessas frações foram incubados com o substrato BAPNA 1mM e 10 mg de tripsina bovina, em pH 8,0 a 37 °C. As setas indicam o valor de máxima inibição da atividade enzimática, correspondente ao primeiro dos possíveis picos (I, II e III) de absorbância a 280 nm (●).
Atividade residual de tripsina/µL de fração, expressa em porcentagem (o)..... 49
- 13 Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR) de filtrados de meio de cultura BD dos isolados 1604 **(A)** e 185 **(B)** de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizoctonia solani* **(C)**. A coluna cromatográfica (60 x 1,5 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo de 18 mL/h. Absorbância a 280 nm (o)..... 50
- 14 Efeito de diferentes concentrações de proteína de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina, sobre o crescimento micelial *in vitro* do isolado 1604 de *Pisolithus tinctorius*, durante 12 dias **(A)**, e do isolado 185, durante 9 dias de incubação **(B)**, em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=1 µg; ■=3 µg; ●=7 µg; *=15 µg; o=20 µg. As barras representam as médias ± erro padrão..... 53
- 15 Efeito de diferentes concentrações de proteína de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de

- tripsina, sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, durante 3 dias de incubação, em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=1 µg; ■=3 µg; ●=7 µg; *=15 µg; o=20 µg. As barras representam as médias ± erro padrão..... 54
- 16 Aspecto das colônias do isolado 1604 (compatível - **A**) de *Pisolithus tinctorius*, após 12 dias de incubação, e do isolado 185 (incompatível - **B**), após 9 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações de proteínas (1, 3, 7, 15 e 20 µg/placa) de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina 55
- 17 Aspecto das colônias de *Rhizoctonia solani*, após 3 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações de proteínas (1, 3, 7, 15 e 20 µg/placa) de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina..... 56

INIBIDOR DE TRIPSINA EM *Eucalyptus urophylla* E SEU EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *in vitro* DE *Pisolithus tinctorius* E *Rhizoctonia solani*

Autora: CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

Plantas, animais e microrganismos apresentam inibidores de proteases, os quais são proteínas que podem complexar-se com proteases de microrganismos e insetos herbívoros, inibindo sua capacidade proteolítica. Estes inibidores pertencem ao grupo de proteínas e enzimas que participam dos mecanismos de defesa das plantas, mas não há relatos quanto ao seu papel em interações simbióticas. Desta maneira, este trabalho teve por objetivos verificar a presença de inibidores de proteases em *E. urophylla* e sua influência sobre o crescimento micelial *in vitro* do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*, isolado 1604 (compatível com *E. urophylla*) e isolado 185 (incompatível), e também do patógeno *R. solani*, causador de tombamento de mudas em viveiros de plantas.

Para se atingir os objetivos propostos, os extratos protéicos brutos de sementes, raízes e folhas de *E. urophylla* foram incubados com BAPNA (α -benzoil-arginina-*p*-nitroanilida) e BTPNA (α -benzoil-tirosina-*p*-nitroanilida), substratos sintéticos cromogênicos para tripsina/papaína e para quimotripsina (Sigma), respectivamente, em presença de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) para tripsina e quimotripsina e tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,5) para papaína. Os resultados mostraram atividades de inibidores de tripsina e de papaína em sementes. A atividade de inibidor de tripsina também foi observada em raízes e folhas. A massa molecular do inibidor de tripsina de sementes, raízes e folhas foi estimada em cerca de 76 KDa, através de cromatografia líquida de exclusão molecular.

O extrato bruto de sementes e frações do mesmo extrato, parcialmente purificadas por cromatografia de exclusão molecular, usando Sephacryl S-100-HR, com atividade de inibidor de tripsina, foram testados sobre o crescimento dos fungos. Os fungos foram cultivados em placas de Petri (5 cm de diâmetro), contendo 7 mL de meio BDA previamente adicionado de 0, 21 e 47 μg de proteínas do extrato bruto ou de 0, 1, 3, 7, 15 e 20 μg de proteínas das frações. A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford, com albumina de soro bovino como padrão. As duas concentrações de proteínas do extrato bruto de sementes testadas e as concentrações superiores a 7 μg de proteína/placa das frações com atividade inibitória de tripsina apresentaram efeito fungistático sobre ambos os isolados de *P. tinctorius*, mas não alteraram o crescimento de *R. solani*. As proteínas da planta hospedeira com atividade de inibidor de tripsina apresentaram efeitos diferentes sobre o crescimento do fungo simbionte e do patogênico. Porém, a ausência de atividade de tripsina nos isolados de *P. tinctorius* e de *R. solani*, verificada através da incubação do meio de cultivo BD, onde cresceram previamente esses fungos, com o substrato BAPNA, não permitiu uma correlação direta da inibição do crescimento com a atividade do inibidor de tripsina de sementes.

**TRYPSIN INHIBITOR OF *Eucalyptus urophylla* AND ITS EFFECT ON *in vitro*
MYCELIAL GROWTH OF *Pisolithus tinctorius* AND *Rhizoctonia solani***

Author: CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

Plants, animals and microorganisms contain protease inhibitors, proteins which form complexes with microorganisms and herbivore insect proteases, causing inhibition of the proteolytic capacity. Inhibitors belongs to the group of proteins and enzymes which participate in the plant defense mechanisms, but no references to symbiotic interactions are reported. The objectives of the study were to verify the presence of protease inhibitors in *E. urophylla* and their effect on *in vitro* mycelial growth of the ectomycorrhizal fungus *P. tinctorius*, isolate 1604 (compatible with *E. urophylla*) and isolate 185 (incompatible), and on the plant pathogenic fungus *R. solani*, agent of damping-off in nursery plants.

The crude protein extracts from seeds, roots and leaves of *E. urophylla* were incubated with BAPNA (α -benzoyl-arginyl-*p*-nitroanilide) and BTPNA (α -benzoyl-tyrosine-*p*-nitroanilide), synthetic chromogenic substrates for trypsin/papain and for chymotrypsin (Sigma), respectively, and with Tris-HCl buffer 0,1 M (pH 8,0) for trypsin and chymotrypsin or sodium acetate buffer 0,2 M (pH 5,5) for papain. The results showed activities of trypsin and papain inhibitors in seeds. It was also observed activity of trypsin inhibitor in roots and leaves. The molecular mass of the trypsin inhibitor from seeds, roots and leaves was estimated to be around 76 KDa, based upon molecular sieving chromatography.

The crude protein extract from seeds and fractions partially purified by molecular sieving chromatography, using Sephacryl S-100-HR, with inhibitory activity against trypsin, were tested on fungal growth. The fungi were cultivated inside Petri dishes (5 cm diameter) containing 7 mL of PDA medium previously flooded with 0, 21 e 47 μg proteins from the crude extract or 0, 1, 3, 7, 15 e 20 μg proteins from the fractions. The protein concentration was estimated by the method of Bradford, using bovine serum albumin as standard. The two concentrations of proteins from seed crude extract tested and the concentrations higher than 7 μg protein/plate of the fractions with inhibitory activity against trypsin exhibited fungistatic effect on both isolates of *P. tinctorius*, but did not change the growth of *R. solani*. The trypsin inhibitor preparation of the host plant exhibited different effects on growth of the symbiont and pathogenic fungi. The lack of activity of trypsin by the *P. tinctorius* and *R. solani* isolates, determined by their growth on PD medium with BAPNA, did not allow to establish a direct correlation between the growth inhibition and the activity of the seed trypsin inhibitor.

1 INTRODUÇÃO

Plantas, animais e microrganismos contêm proteínas que apresentam a propriedade de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade dessas proteases por competição pelo seu sítio catalítico. Estas proteínas são denominadas de inibidores de proteases, cuja massa molecular varia de 10 a 90 KDa, na maioria dos casos, podendo exibir alta especificidade ou não em relação à enzima inibida. A maioria dos inibidores de proteases conhecida e caracterizada pertence ao grupo das serino-proteases, como a tripsina (Richardson, 1991).

As proteases extracelulares de fungos e bactérias patogênicos a plantas podem participar dos processos de penetração e infecção (Sikes & Maxcy, 1979). Muitos inibidores são ativos *in vitro* contra proteases produzidas por microrganismos (Yoshikawa et al., 1976; Mosolov et al., 1979; Mosolov & Shulgin, 1986) podendo atuar na defesa das plantas, retardando a proteólise de paredes celulares e de proteínas da membrana e reduzindo, assim, a desorganização celular, dificultando a atuação de microrganismos patogênicos e de simbioses. Outro papel fisiológico geralmente atribuído aos inibidores de proteases é o de regulação da hidrólise de proteínas no interior da célula vegetal.

Diferenças no acúmulo de inibidores de proteases e de proteases em interações compatível e incompatível (Peng & Black, 1976; Giri et al., 1998) podem levar à associação destes grupos de proteínas aos conceitos de resistência e de suscetibilidade, gerando perspectivas de um melhor entendimento das bases bioquímicas que regem as interações planta-patógeno. Contudo, são escassos os estudos que demonstram a participação de inibidores de proteases nos mecanismos de defesa de

plantas cultivadas contra seus patógenos. Para árvores cultivadas em escala comercial, como *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp., não se encontram relatos sobre a ocorrência de inibidores de proteases e consequentemente de seu possível papel sobre fungos patogênicos a essas culturas e mesmo sobre simbioses, como os ectomicorrízicos, naturalmente presentes nos cultivos desses dois gêneros de plantas.

Além da comparação entre interações patogênicas e simbióticas, quanto ao reconhecimento diferencial das plantas hospedeiras, outro fator importante a ser considerado para simbiose, em particular, é a compatibilidade entre planta e isolados de um mesmo fungo simbiote. Diferenças na formação de ectomicorrizas em espécies de eucalipto por *Pisolithus tinctorius* isolado de *Pinus* spp. ou do próprio eucalipto, sugerem a existência de diferenças bioquímicas e fisiológicas entre os isolados deste fungo simbiote, que levariam a associações compatíveis (com a formação de ectomicorrizas funcionais) ou não (Krugner & Tomazello Filho, 1979; Yokomizo, 1981; Malajczuk et al., 1990; Schmidt et al., 1992; Schwan-Estrada, 1997; Baptista, 2000).

Com base no exposto, o presente trabalho tem por objetivo verificar a presença de inibidores de proteases em *Eucalyptus urophylla*, bem como a influência do inibidor que venha a ser encontrado sobre o crescimento micelial de isolados compatível e incompatível do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* e do patógeno *Rhizoctonia solani*, causador de tombamento de plântulas e de podridão de estacas em eucalipto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interações entre plantas e microrganismos - simbiose e parasitismo

Plantas têm interagido com fungos desde o início de sua adaptação terrestre, sendo que o mutualismo deve ter exercido um papel crucial na evolução dos fototróficos (Selosse & Le Tacon, 1998). Fósseis e dados moleculares sugerem que fungos simbióticos existem há cerca de 350 a 460 milhões de anos. Assim, muito cedo as plantas provavelmente adaptaram-se, em sua evolução, em interagir com fungos, repelindo ou acomodando parasitas e, em algumas ocasiões, colaborando e formando simbioses. Todas as plantas interagem, simultaneamente, com diversas espécies fúngicas, de tipos biológicos distintos e, como consequência, para proteger sua integridade precisam diferenciar entre fungos saprofíticos, patogênicos e simbióticos junto aos diferentes níveis de sua organização espacial (sementes, ramos, raízes e flores) e temporal.

As interações patogênicas são descritas, frequentemente, como altamente específicas (Knogge, 1996). Em contraste, associações simbióticas entre raízes de plantas superiores e micélio fúngico são menos específicas e largamente difundidas (Gianinazzi-Pearson, 1996). Uma espécie vegetal pode apresentar mais de um tipo de associação micorrízica, como é o caso do eucalipto, que pode formar micorrizas arbusculares ou ectomicorrizas, sendo predominantemente ectomicorrízico na fase adulta da planta (Smith & Read, 1997). No caso de árvores leguminosas, como *Acacia* sp., as raízes também podem associar-se com bactérias fixadoras de nitrogênio, do tipo *Rhizobium* sp. Desta maneira, plantas superiores seriam capazes de reconhecer seus

"invasores" e, rapidamente, desencadear a reação de defesa apropriada. Mecanismos similares são provavelmente utilizados para o reconhecimento de microrganismos benéficos ou deletérios, nos primeiros estágios da interação (Barker et al., 1998).

2.2 Micorrizas

Micorrizas são associações simbióticas entre raízes de plantas e fungos. Dentre os tipos de micorrizas, as mais importantes, para a agricultura e para ciências florestais, são as micorrizas arbusculares (fungos Zigomycetes) e as ectomicorrizas (fungos Basidiomycetes e Ascomycetes). Juntas, ocorrem na maioria das plantas terrestres. Embora existam algumas exceções, fungos micorrízicos arbusculares estão comumente associados com Angiospermas e os ectomicorrízicos com Gimnospermas. Ambos exibem ampla gama de hospedeiros e um mesmo sistema radicular pode ser colonizado por diferentes espécies de fungos micorrízicos ao mesmo tempo (Peterson & Farquhar, 1994).

As micorrizas são simbioses tipicamente mutualistas, onde ambos os participantes são beneficiados. Os fungos recebem carbono fixado pela planta hospedeira e esta, por sua vez, recebe benefícios como o aumento na absorção de nutrientes e água, e maior resistência a doenças. Os ectomicorrízicos podem viver saprofiticamente, enquanto que os micorrízicos arbusculares não, o que facilita os estudos com relação ao primeiro grupo, embora cresçam vagarosamente em meio de cultivo sintético (Agerer, 1993).

Mesmo sendo a importância prática das micorrizas na horticultura, ciências florestais e agricultura em geral bem conhecida (Pfleger et al., 1994), a aplicação da genética molecular e de estudos bioquímicos e fisiológicos para estes fungos simbiontes é de ocorrência recente.

2.2.1 A associação ectomicorrízica

O primeiro estágio da colonização envolve contato físico através de camadas externas de paredes celulares e de matriz extracelular dos dois associados (fungo-planta), onde algumas moléculas especializadas (como proteínas e carboidratos) devem desempenhar papéis essenciais. A germinação de esporos, ou o crescimento de hifas, ou ambos, ocorrem através de quimio ou tigmotropismo e, finalmente, as hifas chegam à superfície ou penetram os tecidos hospedeiros. Em cada estágio, há um controle genético e molecular em cada participante, informando a planta da presença de um microrganismo e vice-versa (Barker et al., 1998). No caso da colonização de raízes arbóreas por fungos ectomicorrízicos, as plantas não apresentam mecanismos que impeçam o progresso do micélio em seu interior e permitem o desenvolvimento de novas estruturas radiculares, favoráveis ao funcionamento da simbiose.

Na rizosfera, os dois integrantes da estrutura ectomicorrízica são confrontados por outros microrganismos, dentre os quais algumas bactérias associadas com a superfície das hifas fúngicas que podem ajudar na simbiose (Garbaye, 1994). Uma hipótese para a função dessas bactérias auxiliares é baseada em sua capacidade de estimular o crescimento do micélio do fungo e, como consequência, ajudar em colonizações futuras das raízes, o que leva a crer que os diferentes microrganismos que interagem com a ectomicorriza possam fazer parte dos processos de estabelecimento e funcionamento da simbiose.

A organização geral da anatomia de uma ectomicorriza é baseada em hifas extramatriciais no substrato, conectadas às hifas que circundam as raízes, as quais estão em contato com as hifas que penetraram as células radiculares (Figura 1). As hifas extramatriciais são essenciais ao funcionamento da simbiose, uma vez que são capazes de mobilizar, absorver, assimilar e transportar macro-nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, para outras partes dos tecidos simbióticos (Smith & Read, 1997). Este micélio é hábil em originar corpos de frutificação produtores de esporos, apenas quando associados com seu hospedeiro, indicando a importância da simbiose funcional

para a disseminação do fungo. Raízes micorrizadas são cobertas por uma camada fúngica, chamada de manto, o qual as isola de seu substrato. Este agregado de hifas e sua anatomia são comumente usados para identificar a espécie do fungo associado à raiz e sua função principal parece ser o armazenamento de metabólitos fúngicos, agindo como uma zona de transição entre o substrato e a superfície da raiz. Finalmente, para o interior do manto, as hifas desenvolvem uma estrutura em forma de labirintos entre células epidérmicas e corticais da raiz, que é a rede de Hartig. Esta é a interface funcional entre planta e fungo e representa o sítio funcional de troca de açúcares e nutrientes (Massicotte et al., 1987; Peterson & Farquhar, 1994).

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas de uma ectomicorriza. cm: cordão micelial; rH: rede de Hartig; m: manto. Adaptado de Beyrle (1995)

Associado ao sistema radicular, o micélio é favorecido por fotoassimilados alocados pela planta hospedeira (Harrison, 1997). Os principais carboidratos acumulados nas células fúngicas são manitol, trealose e glicogênio (Hampp & Schaeffer, 1995). A absorção de nitrogênio é realizada pelo micélio extramatricial, que é capaz de assimilar nitrogênio orgânico e inorgânico (Martin & Botton, 1993; Chalot & Brun, 1998). Em solos florestais o nitrogênio orgânico é muito mais abundante que o inorgânico, mas a aquisição de nitrogênio orgânico é difícil de ser estudada, devido à grande diversidade de formas, mas proteases, nucleases e quitinases são provavelmente essenciais. O nitrogênio assimilado pelo micélio é metabolizado principalmente em glutamina, aspartato, asparagina e alanina, sugerindo que estes aminoácidos representam a forma de nitrogênio que passa do micélio para as células radiculares (Martin, 1985; Kottke et al., 1995).

O desafio atual é caracterizar genes e/ou proteínas responsáveis por esses padrões morfogênicos e por seus vários processos fisiológicos. A formação de tecidos ectomicorrízicos envolve a liberação e o reconhecimento de sinais, bem como a regulação de genes e expressão de proteínas, que são essenciais ao funcionamento bem sucedido da interação.

2.2.2 Compatibilidade e especificidade em ectomicorrizas

Com relação à especificidade, os fungos ectomicorrízicos foram divididos em três categorias: a) fungos com grande potencial ectomicorrízico, baixa especificidade e que frutificam naturalmente, como *Thelephora terrestris*, *Cenococcum gramiforme*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata* e *Amanita muscaria*; b) fungos com médio potencial ectomicorrízico, com certa especificidade, frutificação limitada e dependentes do hospedeiro, como *Suillus lakei* x *Pseudotsuga menziesii*, *Rhizopogon vinicolor* x *Pinus* sp.; e c) fungos com baixo potencial ectomicorrízico, os quais associam-se a apenas uma espécie hospedeira, como *Suillus*

spp. e *Rhizopogon* spp. que são específicos para algumas coníferas (Molina & Trappe, 1982).

O fungo *P. tinctorius* é amplamente distribuído em solos florestais, de ocorrência natural e associa-se a um grande número de espécies arbóreas, entre elas o eucalipto (Marx, 1977). Apresenta crescimento satisfatório em meio de cultivo, permitindo estudos experimentais em laboratório e a produção de inóculo para formação de mudas, em reflorestamento (Krugner, 1986).

A compatibilidade dos fungos simbiontes para com as espécies hospedeiras deve estar relacionada com o pioneirismo destas últimas (Kropp & Trappe, 1982). A avaliação da colonização por fungos ectomicorrízicos, em seis populações de *Eucalyptus dunnii*, distribuídas em quatro áreas antigamente cultivadas com *Eucalyptus viminalis*, *Pinus taeda* e soja, mostrou que a cultura antecedente desempenhava um papel importante no potencial de inóculo e que a baixa formação de ectomicorrizas observada nas áreas onde havia sido cultivado *P. taeda*, poderia resultar da incompatibilidade de fungos adaptados a *Pinus* com outra espécie hospedeira (Schmidt et al., 1992).

A baixa especificidade de *P. tinctorius* em relação a alguns hospedeiros do gênero *Eucalyptus* é ilustrada na literatura. A inoculação de culturas puras de *P. tinctorius* em *E. maculata*, *E. fastigata*, *E. sieberi*, *E. radiata*, *E. bridgesiana*, *E. stjohnnii*, *E. dabrymphena*, *E. polyanthemom* e *E. leucoxydon* permitiu a formação de ectomicorrizas funcionais (Chilvers, 1973). Dezenove isolados de *P. tinctorius* foram testados quanto à infectividade e eficiência, em casa-de-vegetação, em relação a *E. dunni* e *E. viminalis*, e apenas os isolados Pt-23, Pt-26 e Pt-44 foram específicos para *E. dunnii*, não havendo especificidade de qualquer isolado para *E. viminalis* (Oliveira et al., 1992).

Isolados de *P. tinctorius*, obtidos de plantações de eucalipto, foram comparados com isolados da mesma espécie, obtidos de plantações de *Pinus taeda*, com relação à capacidade de formação de micorrizas em mudas de *E. saligna* e *P. taeda*, através de infestação do solo com inóculo vegetativo dos dois isolados. Houve formação

de ectomicorrizas somente em *P. taeda*, em solo infestado com *P. tinctorius* isolado anteriormente da mesma espécie hospedeira, sugerindo a especificidade entre planta hospedeira e simbiote (Yokomizo, 1981). Por outro lado, a observação da ocorrência natural de *P. tinctorius* unicamente em plantios de *Eucalyptus* spp., mesmo nas proximidades de *Pinus* spp., indicou a possibilidade de existência de isolados do fungo específicos para *Eucalyptus* e de outros para *Pinus* (Krugner & Tomazello Filho, 1979).

Para *E. urophylla*, algumas observações do fenômeno de compatibilidade ou incompatibilidade em relação a diferentes isolados de *P. tinctorius* podem ser citadas. Um isolado coletado em plantação de eucalipto colonizou rapidamente as raízes de *E. urophylla* e iniciou a micorrização dois dias após a inoculação, enquanto que um isolado coletado em plantação de *Pinus* desenvolveu micorriza somente após sete dias da inoculação, na mesma espécie de eucalipto. Os autores sugeriram a condução de trabalhos para elucidar as diferenças fisiológicas e bioquímicas entre diferentes isolados de *P. tinctorius* na interface fungo-raiz de eucalipto (Malajczuk et al., 1990).

As pesquisas de Schwan-Estrada (1997) e Baptista (2000) vieram de encontro a proposta referida acima. A primeira autora avaliou a produção *in vitro* de enzimas celulolíticas e xilanase por dois isolados de *P. tinctorius*: o 1604, isolado de *E. grandis* e considerado compatível para *E. urophylla*, em testes de micorrização pela técnica do papel sanduíche (Chilvers et al., 1986), e o 185, isolado de *P. taeda* e citado como incompatível a *E. urophylla*, por não formar ectomicorrizas típicas e funcionais. Os dois isolados puderam ser diferenciados quanto à atividade de celulasas e xilanase. Em estudo subsequente com os mesmos isolados do fungo, a segunda autora demonstrou haver diferenças para a atividade de peroxidase, nos estágios iniciais da formação de ectomicorrizas, em plântulas de *E. urophylla*, também pela técnica do papel sanduíche, mostrando um comportamento diferencial da planta hospedeira em relação aos diferentes isolados de *P. tinctorius*, novamente citados como compatível e incompatível.

Porém, seria conveniente uma certa cautela ao se utilizar o termo "incompatível" para o isolado 185 de *P. tinctorius*, já que o mesmo é capaz de promover

a infecção de raízes de *E. urophylla* em plântulas, de maneira muito semelhante àquela do isolado chamado de compatível. Após alguns dias do início da formação de ectomicorrizas, nos dois casos, é que se verifica que a ectomicorriza formada pelo isolado 185 não se desenvolve de maneira típica e funcional (Baptista, 2000)

2.3 Principais patógenos relacionados a espécies de eucalipto

Dentre os principais patógenos que causam doenças em cultivos de espécies de eucalipto (Krugner & Auer, 1997), pode-se mencionar *Rhizoctonia solani* (tombamento de mudas e podridão de estacas), *Cylindrocladium* spp. (tombamento de mudas, podridão de estacas e mancha foliar), *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. (tombamento de mudas e podridão de raiz), *Fusarium* spp. (tombamento de mudas e podridão de estacas), *Colletotrichum* sp. (podridão de estacas), *Botrytis cinerea* (mofo cinzento), *Ralstonia solanacearum* (murcha vascular), *Cryphonectria cubensis* (cancro), *Phanerochaete salmonicolor* (doença rosada), *Puccinia psidii* (ferrugem), *Oidium* sp. (oídio) e *Botryosphaeria* spp. (cancro).

No caso de *Rhizoctonia solani*, o emprego de técnicas de formação de mudas, como a semeadura direta em tubetes suspensos, desfavorecem a ocorrência do tombamento, tornando a doença de importância limitada em viveiros. Nas sementeiras efetuadas para obtenção de mudas para posterior repicagem ou para obtenção de mudas de raiz nua, a tendência de ataques mais severos é maior, podendo causar redução no número de mudas. As mesmas considerações podem ser feitas para a podridão de estacas.

2.4 Bioquímica das interações patogênicas e simbióticas

Devido ao íntimo contato planta-fungo em micorrizas, a colonização das raízes hospedeiras ocorre sem forte indução de respostas de defesa da planta (Koide & Schreiner, 1992; Gianinazzi-Pearson, 1996), mas exemplos demonstram que respostas

de defesa podem ser elicitadas. Durante a formação de micorrizas arbusculares em *Medicago truncatula*, uma resposta oxidativa foi desencadeada em sítios de células do córtex da raiz onde ocorreu a tentativa de penetração de hifas (Salzer et al., 1999). Em raízes de *Allium porrum*, um aumento na atividade de peroxidase e quitinase foi induzido nos primeiros estágios da formação micorrízica (Spanu et al., 1989) e também na micorrização de alfafa (Harrison & Dixon, 1993) e *Phaseolus vulgaris* (Blee & Anderson, 1996) houve indução da atividade de quitinase e chalcona-sintase. Similarmente, em ectomicorrizas jovens de lariço, um acúmulo de fenilpropanóides foi observado (Weiss et al., 1997). Estes trabalhos indicam que a despeito do caráter mutualístico das associações micorrízicas, as plantas hospedeiras reconhecem o fungo simbionte e podem reagir, inicialmente, com alguns elementos de resposta de defesa.

Neste contexto, convém lembrar que fungos micorrízicos contém quitina em suas paredes celulares, assim como fungos patogênicos. É bem possível que fragmentos de paredes celulares destes fungos, como oligômeros de quitina, sejam reconhecidos pelas plantas como elicitores, de maneira muito similar ao que ocorre com fragmentos de parede celular de fungos patogênicos (Boller, 1995).

No caso de interações de plantas com fungos patogênicos, é bem conhecido que fragmentos de parede celular do fungo, chamados elicitores, podem agir como sinais para desencadear respostas de defesa em plantas. Os elicitores são capazes de ligar-se a sítios de alta afinidade, prováveis receptores, na membrana plasmática de células hospedeiras (Baureithel et al., 1994) e de ativar uma cascata de transdução de sinais, incluindo fluxo de íons, fosforilação protéica, estímulo de proteínas-G e síntese de peróxido de hidrogênio. Ultimamente, sabe-se que o reconhecimento de elicitores leva à expressão de genes de defesa em plantas e, por exemplo, a formação de fitoalexinas (Legendre et al., 1992; Jabs et al., 1997; Ligterink et al., 1997).

As plantas apresentam vários mecanismos de defesa. Um dos mecanismos mais estudados é a produção de famílias de endo- β -1,3-glucanases e quitinases que atuam sobre polissacarídeos da parede celular de microrganismos. Estas glucanases são frequentemente proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), sintetizadas pelas

plantas em resposta à tentativa de infecção (Stintzi et al., 1993). As quitinases e glucanases são capazes de degradar as β -1,3-glucanas e componentes de quitina do micélio fúngico, gerando elicitores, que em concentrações nanomolares, ativam respostas de defesa nas plantas. O crescimento *in vitro* de alguns fungos é inibido pela presença de glucanases ou quitinases (Schlumbaum et al., 1986; Mauch et al., 1988; Roberts & Selitrennikoff, 1988). Além de apresentar compostos capazes de agir diretamente sobre a parede celular fúngica, as plantas podem defender-se também pela inibição de enzimas produzidas por fitopatógenos, as quais têm por objetivo facilitar a penetração do patógeno e posterior colonização dos tecidos hospedeiros. Alguns exemplos incluem as proteínas inibidoras de poligalacturonases, que estão presentes em um grande número de dicotiledôneas (Hahn et al., 1989) e uma proteína inibidora de pectinaliase, isolada de beterraba (Bugbee, 1993). Endopoligalacturonases e pectinaliases são enzimas fúngicas que degradam componentes homogalacturonas da lamela média e parede celular primária de plantas e, em alguns casos, são requeridas para a patogenicidade de fungos (Cooper, 1983).

Outros tipos de proteínas inibidoras são produzidas pelas plantas, incluindo inibidores de proteases e α -amilases, que protegem-nas contra insetos e patógenos. Os inibidores de proteases e seu papel na patogenicidade receberão atenção especial, posteriormente, nesta revisão.

Na competição bioquímica entre plantas e microrganismos patogênicos, estes últimos também desenvolveram mecanismos para se defender do ataque enzimático das plantas. Muitos são os exemplos em que β -1,3-glucanases e quitinases de plantas não são capazes de inibir o crescimento de fungos, especialmente quando usadas individualmente. Quitinases e β -1,3-glucanases purificadas de ervilha não inibiram o crescimento, em cultura, da maioria dos fungos testados quando utilizadas individualmente, enquanto uma combinação destas enzimas foi efetiva em inibir o crescimento da maioria dos mesmos fungos (Mauch et al., 1988). Quitinases purificadas de *Arabidopsis*, fumo e trigo (Verburg & Huynh, 1991) inibiram o crescimento de alguns fungos saprofíticos, mas não tiveram efeito sobre fungos fitopatogênicos, mesmo

apresentavam quitina em sua parede celular. Quitinases e glucanases purificadas de tomate não inibiram o crescimento do patógeno *Cladosporium fulvum*, mas inibiram o crescimento de *Trichoderma viride*, que não é um patógeno (Joosten et al., 1995). Plantas transgênicas de tomate, superexpressando uma quitinase, não exibiram resistência a *Cercospora nicotianae*, um patógeno fúngico específico para a cultura (Neuhaus et al., 1991). Todavia, alguns fungos que são sensíveis a β -1,3-glucanases e/ou quitinases podem tornar-se resistentes a estas enzimas após algumas horas de exposição a elas, indicando a habilidade de adaptação dos fungos (Ludwig & Boller, 1990). O patógeno *Phytophthora sojae* f. sp. *glycinea* produziu um inibidor de endo- β -1,3-glucanase que foi capaz de inibir apenas uma das duas enzimas deste tipo produzidas pela soja, sua hospedeira, demonstrando que este inibidor é altamente específico (Ham et al., 1997).

Para vários fungos ectomicorrízicos, entre eles *Amanita muscaria* e *Suillus variegatus* (Salzer et al., 1997), *Hebeloma crustuliniforme* (Salzer et al., 1996) e *Thelephora terrestris* (Campbell & Ellis, 1992) foi demonstrado que são também capazes de liberar elicitores. As raízes de plantas hospedeiras, por sua vez, são capazes de responder aos elicitores de fungos micorrízicos. Por exemplo, elicitores de *A. muscaria* (Sauter & Hager, 1989) e de *H. crustuliniforme* (Salzer et al., 1997) induziram aumento de quitinase e a expressão de isoformas adicionais dessa enzima em raízes de abeto (*Picea abies*), enquanto que elicitores de *P. tinctorius* e *S. variegatus* induziram novas isoformas em raízes de eucalipto. Em culturas de células de *Pinus* sp., elicitores de *T. terrestris* estimularam o metabolismo de fenilpropanóides (Campbell & Ellis, 1992). Interessante é a comparação de respostas induzidas por elicitores ectomicorrízicos e por aqueles do fungo patogênico *Fusarium oxysporum* (Bach & Seitz, 1997) e *Heterobasidium annosum* em células de abeto e lariço (Schwacke & Hager, 1992; Mensen et al., 1998), que mostrou que as células das plantas respondiam com as mesmas reações aos dois tipos de elicitores.

2.4.1 Supressão de defesa das plantas com micorrizas

Embora existam evidências para a ação de elicitores nos estágios iniciais da formação de micorrizas, a resposta de defesa elicitada é geralmente menos intensa que em interações planta-patógeno (Mohr et al., 1998) e, muitas vezes, completamente suprimida, principalmente em estágios tardios da interação (Franken & Gnadinger, 1994; Boller, 1995; Gianinazzi-Pearson, 1996). Estes fatos podem ser explicados pela existência de supressores produzidos por fungos micorrízicos que interferem no reconhecimento de elicitores (Lambais & Mehdy, 1993). Um precedente para esta suposição são supressores cíclicos de β -1,3-1,6-glucanas de *Bradyrhizobium japonicum* que ligam-se ao mesmo sítio que glucanas elicitoras fúngicas e previnem a indução de resposta de defesa (Mithofer et al., 1996).

Experimentos em um sistema modelo consistindo de suspensão de células de abeto e elicitores liberados de paredes celulares de fungos ectomicorrízicos apresentaram algumas evidências para duas outras hipóteses (Salzer & Hager, 1993; Salzer et al., 1997b; Mensen et al., 1998). A primeira delas é que elicitores relacionados à quitina da parede celular desses podem ser inativados enzimaticamente pela ação de quitinases extracelulares da planta hospedeira, de maneira análoga à inativação de fatores *Nod* que ocorre na simbiose *Rhizobium*-leguminosa (Staehelin et al., 1994). Duas isoformas de quitinase altamente purificadas, a partir de cultura de células de abeto, foram usadas para tratar elicitores liberados por paredes celulares de vários fungos ectomicorrízicos. As atividades de preparações de elicitores tratados e não tratados foram comparadas com relação à sua habilidade em induzir fluxos de potássio e cloro, influxo de hidrogênio, fosforilação e síntese de peróxido de hidrogênio em células de abeto. Ambas isoformas de quitinase reduziram a habilidade dos elicitores em induzir todas estas reações (Salzer et al., 1997b). Em contraste, o tratamento desses elicitores com β -1,3-glucanase (também purificada de culturas de células de abeto) não tiveram influência significativa sobre suas propriedades. Análises através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) dos produtos de clivagem liberados dos

elicitores fúngicos por estas quitinases revelaram que a redução da capacidade de elicitação era devida a uma clivagem enzimática em fragmentos com um baixo grau de polimerização. As quitinases, primeiramente, liberaram produtos monoméricos dos elicitores ectomicorrízicos.

Outros trabalhos também evidenciam o papel de quitinases em micorrizas. Em raízes de abeto, por exemplo, alta atividade de quitinase constitutiva foi encontrada em partes jovens, onde iniciava-se a colonização por fungos ectomicorrízicos (Salzer & Hager, 1993). Em ectomicorrizas de eucalipto, isoformas específicas de quitinase foram induzidas em resposta à colonização por *P. tinctorius*, mas não pela infecção com o fungo patogênico *F. oxysporum* (Albrecht et al., 1994).

Uma segunda hipótese assume o envolvimento de hormônios vegetais na supressão de respostas de defesa. Alguns fungos micorrízicos (arbusculares ou ecto) mostraram a capacidade de sintetizar hormônios de plantas (Gogala, 1991). A maioria dos fungos ectomicorrízicos sintetiza auxina quando suplementados com os precursores triptofano ou indol (Gay et al., 1989). A presença de auxina em meio de cultivo de células de abeto levou ao acúmulo de peroxidases na parede celular (Mensen et al., 1998), porém a indução de peróxido de hidrogênio nas células não foi influenciada por auxinas, indicando que este hormônio interage com a expressão do gene elicitor-induzido, nos primeiros estágios da cascata de transdução de sinais.

2.5 Proteases e inibidores de proteases nas interações planta-microrganismos

Os inibidores de proteases constituem-se em mais um elemento dentre os vários mecanismos de defesa de plantas contra microrganismos fitopatogênicos, embora a grande maioria das pesquisas já publicadas para esses inibidores concentre-se na defesa de plantas contra insetos herbívoros, havendo um interesse recente da fitopatologia no assunto.

Plantas, microrganismos e animais contém proteínas que apresentam a peculiar propriedade de formar complexos proteína-proteína, estequiometricamente

reversíveis, com várias enzimas proteolíticas, promovendo a inibição dessas proteases por competição pelo seu sítio catalítico. Estas proteínas recebem o nome de inibidores de proteases e são moléculas cuja massa molecular varia de 10 a 90 KDa, na maioria dos casos. São denominados de acordo com a protease inibida e/ou sua fonte como, por exemplo, o inibidor de tripsina de soja. Agrupam-se, também, em famílias, as quais podem receber o nome do pesquisador que primeiro as identificou, como a Kunitz (um inibidor de tripsina pancreática e inibidor de tripsina de soja), a Kazal (um inibidor de tripsina pancreática), a família de subtilisina, a de inibidores Bowman-Birk, a de inibidor de batata I e a do inibidor de batata II (Laskowski & Kato, 1980), entre outras.

As enzimas proteolíticas ou proteases são capazes de clivar ligações peptídicas em cadeias de aminoácidos. São classificadas em endopeptidases ou proteinases (clivam resíduos de aminoácidos internos à cadeia peptídica) e em exopeptidases ou hidrolases (agem em ligações peptídicas próximas ao grupo amino terminal). De acordo com a natureza química do sítio catalítico e sua estrutura, as exopeptidases classificam-se em amino ou carboxipeptidases, por agirem sobre o nitrogênio ou carbono terminais, respectivamente, enquanto que as endopeptidases são representadas por serino-protease (tripsina, quimotripsina, trombina, plasmina, elastase, calicreína - apresentam serina e histidina em seu centro ativo), aspartato ou protease ácida (renina, pepsina), cisteíno (papaína, bromelina e ficina - apresentam cisteína em seu centro ativo) e metaloprotease (contém um íon metálico em seu centro ativo). Os inibidores mais conhecidos são aqueles que afetam a atividade de serino-proteases, de cisteíno-proteases, proteases ácidas e metaloproteases (Richardson, 1991).

A especificidade da inibição exibida por estas proteínas é altamente variável. Alguns inibidores de proteases são capazes de inibir apenas uma ou duas proteases, estritamente relacionadas, enquanto outros são ativos contra diferentes enzimas dentro de uma mesma classe (Weder, 1986).

Em plantas, o primeiro relato de inibidor de protease ocorreu em 1938, por Read & Haas, e os primeiros trabalhos estavam relacionados à nutrição animal, devido aos efeitos deletérios dessa categoria de proteínas, encontrada em muitas plantas

utilizadas na dieta de animais para abate, o que as tornou inicialmente conhecidas como fatores antinutricionais (Ham & Sandstedt, 1945; Klose et al., 1946; Westfall & Hauge, 1948). Os inibidores de tripsina concentram o maior número de pesquisas no assunto, por ser essa enzima uma importante serino-protease do trato digestivo de animais. Até hoje, as famílias Solanaceae, Leguminosae e Graminae são as mais estudadas quanto à atividade de inibidores de proteases, graças à sua importância como fontes de alimentos (Ryan, 1973).

O primeiro inibidor de plantas bem caracterizado foi o de tripsina em soja (Kunitz, 1947). Foi isolado, cristalizado e complexado com tripsina porcina, o que serviu como o primeiro modelo clássico metodológico para a bioquímica de inibidores de proteases.

É generalizada a presença desses inibidores em órgãos de armazenamento de plantas, como sementes (principalmente) e tubérculos, onde atuam como agentes regulatórios de proteases endógenas, como proteínas de reserva e como mecanismo de proteção direta contra insetos ou microrganismos patogênicos (Richardson, 1991).

Quando se fala em inibidores de proteases, uma consideração importante a ser feita é sobre lectinas. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, encontradas em muitos tecidos de plantas e são abundantes em sementes e órgãos de armazenamento de algumas espécies vegetais, assim como os inibidores (Jouanin et al., 1998). Ao se analisar a atividade de inibidores de proteases, é necessário excluir a ação de lectinas que possam estar presentes no mesmo extrato protéico, as quais podem mascarar a resposta desejada. Como são proteínas bem menos resistentes ao calor que os inibidores de proteases (resistentes a temperaturas entre 90 e 100 °C), podem ser inativadas por tratamento térmico do extratos protéicos. antes da determinação da atividade para inibidores (Ryan, 1988).

2.5.1 Papel biológico dos inibidores de proteases

Os altos níveis de inibidores de proteases encontrados em sementes de muitas espécies vegetais levam a algumas suposições sobre seu papel fisiológico. Provavelmente, agem como proteínas de reserva ou armazenamento, como reguladores de enzimas endógenas ou como agentes de defesa contra insetos predadores ou microrganismos patogênicos (Ryan, 1973).

2.5.1.1 Reserva protéica

A maioria dos inibidores de proteases é resistente à denaturação pelo calor, extremos de pH e à ação de algumas enzimas proteolíticas. O alto conteúdo de cisteína e cistina encontrado em inibidores de plantas sugere seu valor como fonte de reserva de enxofre (Hartl et al., 1986).

Poucos estudos foram feitos quanto à localização celular de inibidores de proteases em sementes, mas sabe-se que são encontrados em paredes celulares, espaços intercelulares, no citossol e em vacúolos (Kapur et al., 1989).

2.5.1.2 Controle de enzimas endógenas

Inibidores de proteases podem controlar enzimas endógenas como proteases e α -amilases, prevenindo a hidrólise prematura de materiais de reserva. Há evidências para a existência em cereais de inibidores de α -amilases endógenas, que são responsáveis pela mobilização de amido durante a germinação. Inibidores deste tipo foram isolados de trigo (Mundy et al., 1984) e cevada (Hejgaard et al., 1985). Em milho, ainda, uma pesquisa recente demonstrou que um inibidor de tripsina, isolado da cultura, foi eficiente em inibir a atividade de α -amilase de *Aspergillus flavus* em até 27%, diminuindo a germinação conidial deste fungo e seu crescimento micelial *in vitro*. Em altas

concentrações, porém, o inibidor de tripsina estimulou a produção da enzima (Chen et al., 1999).

2.5.1.3 Defesa contra insetos

Em 1954, Lipke et al. estudaram a toxicidade de inibidores de soja sobre o completo desenvolvimento de *Tribolium confusum*, uma praga comum de grãos armazenados, após a observação de que larvas de certos insetos eram incapazes de se desenvolver sobre sementes de soja armazenada. Embora os resultados tenham sido negativos para tripsina, uma protease abundante no trato digestivo de insetos, os pesquisadores revelaram a presença em soja de um inibidor específico da proteólise digestiva de larvas de *Tribolium*.

Applebaum (1964) propôs que leguminosas apresentavam inibidores de proteases como um mecanismo de defesa contra insetos e que a digestão destes poderia ser considerada como um fator na seleção do hospedeiro. Deste ponto de vista, inibidores de proteases seriam de grande valor para as plantas, representando de 6 a 10% das proteínas solúveis de muitos órgãos de reserva ou, ainda, 1% em folhas de batata e de tomate (Kafatos et al., 1967). No entanto, apenas muito recentemente, a importância dos inibidores de proteases contra insetos herbívoros foi demonstrada diretamente. Folhas normalmente contém níveis muito baixos de inibidores, mas estes foram fortemente induzidos em folhas de batata e de tomate, quando essas plantas foram atacadas por besouros ou mecanicamente injuriadas (Green & Ryan, 1972). Em solanáceas jovens, o acúmulo de inibidores de serino-proteases iniciou-se após 4 a 5 horas de um único ferimento e foi significativamente aumentado por um segundo ferimento, 15 e 72 horas após o primeiro (Nelson et al., 1983; Peña-Cortés et al., 1988). Em adição à síntese local dos inibidores encontrou-se, também, que sinais partindo do sítio da injúria foram transportados pelo floema e estimularam a síntese de inibidores de proteases por toda a planta. Alguns diferentes mensageiros foram postulados, incluindo oligossacarídeos

(Hahn et al., 1993), ácido abscísico (Peña-Cortés et al., 1989) e uma sistemina (Pearce et al., 1991).

O acúmulo sistêmico de inibidores pode diminuir de acordo com a idade das plantas e não ocorrer naquelas com mais de 30 dias de idade, sugerindo que este envolvimento de inibidores de proteases na defesa vegetal seria restrito a um curto período de tempo, associado aos estágios iniciais de desenvolvimento (Wolfson & Murdock, 1990). Por outro lado, ferimentos e ataques de insetos em plantas maduras resultaram em um rápido aumento nos níveis de inibidores de tripsina em folhas, indicando que os inibidores de proteases podem ser induzidos localizadamente por injúria por toda a vida da planta, mas que a habilidade para produzi-los sistemicamente, em todas as folhas, é aparentemente perdida com a maturação (Jongsma et al., 1994; Alarcon & Malone, 1995). A co-evolução de inibidores de proteases de plantas e proteases de insetos é um interessante paradigma para pesquisas ecológicas, fisiológicas e bioquímicas. Plantas parecem ter desenvolvido inibidores com extraordinárias propriedades contra proteases de insetos. São extremamente resistentes à proteólise e permanecem ativos sob diversas condições de pH, podendo inibir a maioria das classes de proteases conhecidas (Christeller et al., 1994). No entanto, é necessário lembrar que a maioria das pragas tem encontrado, ao longo do tempo, diversas maneiras de tentar reverter os efeitos negativos dos inibidores vegetais, que incluem a produção de proteases para as quais a planta hospedeira não tenha inibidor específico, a degradação proteolítica de inibidores e mutações adquiridas que levam a proteases menos sensíveis a certos inibidores, sem que haja perda de sua atividade proteolítica.

2.5.1.4 Defesa contra patógenos

As proteases extracelulares de fungos e bactérias patogênicos a plantas e podem participar dos processos de penetração e infecção (Sikes and Maxcy, 1979). Muitos inibidores de proteínas são ativos *in vitro* contra proteases produzidas por microrganismos (Yoshikawa et al., 1976; Mosolov et al., 1979; Mosolov & Shulgin,

1986) e se pode considerar que os inibidores atuem na defesa das plantas, retardando a proteólise de paredes celulares e de proteínas da membrana e reduzindo, assim, a desorganização celular, dificultando a atuação de patógenos.

Até 1976, apenas um inibidor altamente específico para uma protease microbiana havia sido isolado de plantas, o inibidor de subtilisina de *Bacillus subtilis*, em cevada (Yoshikawa et al., 1976). No mesmo ano, Peng & Black (1976) observaram que os níveis de inibidores de protease em plantas de tomate aumentaram após a infecção pelo patógeno *Phytophthora infestans*, mas esta resposta da hospedeira somente ocorreu naquelas variedades de tomate que eram resistentes ao fungo, não ocorrendo em variedades suscetíveis. Alguns anos mais tarde, um inibidor específico para uma protease de *Colletotrichum lindemuthianum*, e não ativo contra proteases comerciais, foi isolado de sementes de feijão e parcialmente caracterizado (Mosolov et al., 1984).

Após estes trabalhos pioneiros, uma sequência, que pode ser considerada pequena, de outros trabalhos relacionando inibidores de proteases de plantas à defesa de plantas contra microrganismos, foi desenvolvida.

Na podridão de frutos de tomate por *Botrytis cinerea*, proteínas extraídas da parede celular destes frutos inibiram 70% da atividade de tripsina extracelular do patógeno. Estas mesmas proteínas, quando testadas em relação à tripsina de *Colletotrichum atramentarium*, não apresentaram atividade inibitória, demonstrando especificidade (Brown & Adikaram, 1983).

Uma preparação elicitora de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, um patógeno de fumo, induziu um acúmulo de inibidor de protease e um estímulo da síntese de etileno em suspensão de células da planta. Apenas 30 µg/mL do elicitor foram necessários para a indução e a resposta foi detectada após 12 horas da incubação com o elicitor (Rickauer et al., 1989).

Um estudo comparando o ataque de inseto, a injúria e a infecção por vírus com a atividade de inibidor de tripsina em plantas de fumo adultas e de tomate é encontrado na literatura. Após 12 dias da aplicação dos três tipos de estresse sobre estas plantas, os níveis induzidos de inibidor de tripsina, localizada e sistemicamente, foram

avaliados. Em folhas de tabaco que sofreram ferimentos por corte ou por ataque de insetos, a atividade induzida de inibidor de tripsina foi equivalente. Nas folhas onde houve a infecção pelo vírus do mosaico do fumo (TMV), a indução de inibidor foi dez vezes menor que nos casos anteriores. Em tomate, o nível de inibidor de tripsina em folhas atacadas por insetos foi igual ao das folhas de fumo, para o mesmo tipo de estresse, mas folhas apenas injuriadas por corte apresentaram níveis dez vezes maiores do inibidor. Estes dados mostraram que o estresse biótico, na forma de injúria por insetos ou infecção por vírus, e o estresse abiótico, como o ferimento por corte, podem agir de diferentes maneiras sobre os níveis de inibidores de proteases induzidos (Jongsma et al., 1994).

A associação da indução de protease e quitinase e de inibidor de protease à resistência a um patógeno foi observada no sistema grão-de-bico e *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Os níveis dessas proteínas foram analisados em uma cultivar resistente e outra suscetível ao patógeno, cultivadas em solo infestado. A atividade de quitinase induzida, em raízes da cultivar suscetível, foi equivalente àquela constitutiva da cultivar resistente. A atividade de protease foi identificada apenas em raízes da cultivar resistente, quando em presença do patógeno, e a atividade de inibidores de proteases não foi verificada em nenhum caso (Giri et al., 1998).

2.6 Considerações finais

Para plantas arbóreas, como o eucalipto, a presença de inibidores de proteases e proteases não foi relatada até o momento. Consequentemente, como estes inibidores poderiam atuar nos processos de reconhecimento entre patógenos e simbiontes, pela planta hospedeira, ou nos mecanismos de defesa contra patógenos, nada se pode dizer ou afirmar. No entanto, um diagrama representativo das possíveis interações bioquímicas (considerando-se alguns fatores de origem protéica) entre plantas e microrganismos, simbiontes ou patogênicos, é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Fatores de natureza protéica possivelmente envolvidos na interação entre fungos ectomicorrízicos ou patogênicos e a planta hospedeira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Atividade de inibidores de proteases em sementes de *E. urophylla*

3.1.1 Obtenção do extrato protéico

O extrato protéico bruto foi obtido a partir da trituração de 10 g de sementes de *E. urophylla* (Instituto de Pesquisas Florestais da ESALQ/USP - lote AN - 458; talhão T8I70; Anhembi/SP), em nitrogênio líquido. Ao pó formado, foi adicionada solução salina (NaCl 15%) na proporção de 1:10 (v/v) e a suspensão ficou sob agitação durante 1 h, sendo a seguir centrifugada a 12.300 g por 20 min. O sobrenadante foi recolhido e precipitado com um volume quatro vezes maior ao seu de acetona p.a., mantida em banho de gelo, e o precipitado obtido foi centrifugado a 12.300 g por 20 min. Após a centrifugação, o material protéico precipitado foi recolhido e misturado à água destilada (1:10 p/v), mantido sob agitação por 15 min e centrifugado a 12.300 g por 20 min. O sobrenadante constituiu-se, então, do extrato protéico bruto, a partir do qual foram realizados os testes de atividade inibitória de proteases. A cada vez que se obteve o extrato protéico, a proporção de proteínas foi de, aproximadamente, 0,7 % em relação ao peso fresco de sementes e sua manutenção foi feita em congelador, até a utilização.

3.1.1.1 Efeito de lectinas no extrato protéico

Para a verificação de um possível mascaramento da atividade de inibidores protéicos de proteases pela presença de lectinas, anteriormente à dosagem de atividade inibitória para qualquer protease, foi realizado o aquecimento do extrato bruto a 70 °C por 20 min (Richardson, 1991), temperatura esta suportada pelos inibidores de proteases, mas não pelas lectinas. A comparação da atividade com e sem este aquecimento prévio também foi feita, não havendo diferenças nos valores de absorbância a 405 nm para os dois casos.

3.1.2 Teste para a atividade de inibidor de tripsina

Volumes de 30, 50, 70, 85, 100 e 150 µL do extrato bruto foram incubados com um volume fixo de 100 µL de tripsina (100 µg/mL de HCl 1 mM; Sigma) e com volume variável de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), contendo CaCl₂ 0,01 M, até um volume final de 500 µL em cada tubo de ensaio. Esta mistura de reação foi pré-incubada por 10 min, a 37 °C, e a seguir o substrato cromogênico BAPNA (benzoil-arginina-*p*-nitroanilida; Sigma) foi adicionado em excesso, ou seja, 500 µL de solução 1 mM em DMSO (dimetil sulfoxido de sódio) a cada tubo e houve a incubação por 40 min a 37 °C. A reação foi parada pela adição de 500 µL de ácido acético 30% (v/v) a cada tubo. O controle, representando 100 % da atividade enzimática, foi conseguido pela não adição do extrato protéico à mistura de reação, e os controles para cada dosagem do extrato testada foram obtidos pela adição de ácido acético 30% antes da incubação com o substrato BAPNA. Para cada volume do extrato protéico utilizada, foram feitas 2 repetições para a reação com o substrato e 2 repetições para os tubos controles, onde não ocorreu a reação. Uma média para as leituras de absorbância a 405 nm para as repetições, em cada caso, foi calculada e gerou um valor decorrente da diferença entre os tubos controles e seus respectivos tubos de reação. Este valor, para cada dose do

extrato, foi subtraído daquele valor que representou 100 % da atividade enzimática, permitindo o cálculo da atividade residual de tripsina.

3.1.3 Teste para a atividade de inibidor de quimotripsina

A dosagem de atividade para inibidor de quimotripsina do extrato protéico bruto foi realizada de maneira similar àquela descrita para tripsina, com alteração apenas do substrato utilizado que, para esta protease, foi o BTPNA (α -benzoil-tirosina-*p*-nitroanilida; Sigma) 1 mM em DMSO.

3.1.4 Teste para a atividade de inibidor de papaína

Para a dosagem da atividade de papaína, as mesmas doses crescentes do extrato protéico utilizadas para tripsina e quimotripsina foram testadas, com a adição do substrato BAPNA e em presença de tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,5), adicionado de Triton 0,01% e de DTT (dithiotreitol) 1 mM. Antes de sua adição aos tubos contendo a mistura de reação, a papaína (100 μ g/mL de HCl 1 mM) foi pré-incubada com o tampão por 10 min a 37 °C.

3.2 Efeito do extrato protéico bruto de sementes sobre o crescimento micelial *in vitro* de *P. tinctorius* e de *R. solani*

Para se testar o efeito do extrato protéico bruto de sementes de *E. urophylla* sobre o crescimento *in vitro* do simbiote *P. tinctorius* e do patógeno *R. solani*, ambos os fungos foram cultivados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. Dois isolados de *P. tinctorius* foram testados, o 1604 proveniente de *Eucalyptus grandis* (Rio Claro/SP, pertencente à Micoteca do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ/USP) que é considerado altamente compatível para a formação de ectomicorizas em *E. urophylla* (Galli, 1996) e o isolado 185 proveniente de *Pinus*

taeda (coleção do Dr. Donald Marx, USDA - Forest Service, USA, Georgia), o qual vem sendo denominado de incompatível por não formar ectomicorrizas típicas em *E. urophylla* (Schwan-Estrada, 1997; Baptista, 2000). O patógeno *R. solani* foi isolado de estacas de plântulas de *Eucalyptus* sp., com sintomas de podridão, proveniente de viveiro para reflorestamento. Os fungos utilizados foram mantidos em meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar), em placas de Petri incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro.

Após a dosagem de proteínas totais, através do método de Bradford (1976), foram escolhidas duas doses de proteínas para serem testadas, com base na quantidade de proteína contida nas alíquotas que exibiram atividade inibitória para tripsina, durante os testes preliminares em tubos de ensaio. Foram adicionados ao meio de cultivo BDA recém-vertido nas placas, o equivalente a 21 e 47 μg de proteína, após esterilização do extrato bruto de sementes em filtro tipo Millipore, com poro de 0,2 μm , com 3 repetições para cada concentração de proteínas e para o controle, ao qual não se acrescentou o extrato protéico. Considerando-se o volume do extrato correspondente à concentração de proteína desejada, a quantidade de meio vertido foi ajustada para que cada placa contivesse 7 mL de volume final (BDA+ extrato protéico adicionado). Em cada placa, após o resfriamento do meio de cultivo, foi repicado um disco de 4 mm de diâmetro contendo micélio de *P. tinctorius* ou de *R. solani*, provenientes de colônias com 30 dias de idade. A incubação foi efetuada em câmara de crescimento a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro. As medições de diâmetro cruzado de cada colônia foram realizadas diariamente, com paquímetro, até que as placas controles, para cada espécie, estivessem recobertas de micélio até o bordo. O experimento foi repetido uma vez.

3.3 Atividade de inibidor de tripsina em raízes de *E. urophylla*

3.3.1 Obtenção das raízes a partir de plântulas

Com a finalidade de se verificar se a atividade inibitória para tripsina encontrada nas sementes de *E. urophylla* também era encontrada nas raízes, local da

planta onde realmente ocorre o reconhecimento em relação ao simbiote ou ao patógeno, uma metodologia para a produção de plântulas, mesclando características básicas de produção em substrato vermiculita com outras de cultura de tecidos, foi aqui encontrada (Tremacoldi & Pascholati, 2000). Isso porque a obtenção de plântulas em vermiculita ou substratos orgânicos, rotineiramente utilizados comercialmente, apresenta a desvantagem da incorporação de resíduos às raízes jovens e porosas, indesejável para sua utilização com fins de análises bioquímicas.

Testes preliminares foram conduzidos, visando um sistema de cultivo que permitisse um crescimento satisfatório das plântulas e com raízes isentas de resíduos. Tubos de vidro de 19 mm de diâmetro por 97 mm de altura contendo solução de Sarruge 50% (Galli, 1996) foram autoclavados e adicionados de 0,25%, 0,5% e 2% de ágar, com 20 repetições para cada quantidade de ágar testada e um volume final ajustado para 8 mL, em cada tubo. Para cada tubo de ensaio foi transplantada uma plântula, recém-germinada em placas contendo ágar-água, com um par de folhas cotiledonares e, aproximadamente, 1 cm de altura. A vedação dos tubos foi realizada com algodão e a porção inferior de cada tubo foi envolta por papel alumínio até a altura do meio de cultivo, de tal maneira que as raízes a serem formadas ficassem no escuro. A incubação foi feita em câmara de crescimento a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h (luz fluorescente), durante 45 dias e o sistema de cultivo é ilustrado pelas Figuras 3, 4 e 5.

A avaliação das plântulas assim produzidas permitiu a escolha da melhor combinação Sarruge:ágar, a qual foi utilizada para a produção das 560 plântulas que serviram para a obtenção das raízes necessárias para a extração do extrato protéico. Estas plântulas foram incubadas sob as mesmas condições já descritas para os testes preliminares.

3.3.2 Obtenção do extrato protéico de raízes

As raízes de cada plântula (Figura 5) foram retiradas dos tubos, lavadas em água destilada e secas ao ar até peso constante, por aproximadamente 3 dias. Das 560

plântulas, 320 mg de raízes secas foram obtidas e utilizadas para a extração de proteínas.

As raízes foram trituradas em nitrogênio líquido e ao pó formado foram adicionados 30 mL de solução salina (NaCl 15%), ficando a suspensão sob agitação por 30 min e sendo posteriormente centrifugada a 12.300 g por 25 min. O sobrenadante foi recolhido e precipitado com um volume 4 vezes maior de acetona, mantida em banho de gelo, sendo o material centrifugado a 12.300 g por 25 min. O precipitado de proteína formado foi ressuspensão em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e a suspensão ficou sob agitação por 15 min. Após centrifugação a 12.300 g por 15 min, o sobrenadante foi recolhido e mantido em congelador até sua utilização para os testes de atividade inibitória.

3.3.3 Teste para atividade de inibidor de tripsina

O extrato protéico bruto de raízes foi testado para a atividade de inibidor de tripsina. Inicialmente, várias doses do extrato foram utilizadas, como 30, 50, 75, 90, 100, 125, 175 e 200 µL, as quais foram incubadas com 100 µL de tripsina (100 µg/mL de HCl 1 mM) e volume variável de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), contendo CaCl_2 0,01 M até se atingir um volume final de 600 µL por tubo. A mistura foi incubada por 10 min a 37 °C e a seguir foram adicionados 500 µL do substrato BAPNA (1 mM em DMSO) a cada tubo e procedeu-se a mais 40 min de incubação a 37 °C. A reação foi finalizada pela adição de 500 µL de ácido acético 30% (v/v). Os tubos de reação foram em duplicata, para cada dose do extrato protéico testada, e seus respectivos controles também em duplicata, os quais constavam da adição de ácido acético antes do substrato. O controle representando 100% da atividade enzimática foi obtido pela mistura de reação sem a presença do extrato de proteínas. Uma média para as leituras de absorbância a 405 nm para as repetições, em cada caso, foi calculada e gerou um valor decorrente da diferença entre os tubos controles e seus respectivos tubos de reação. Este

valor, para cada dose do extrato, foi subtraído daquele valor que representou 100 % da atividade enzimática, permitindo o cálculo da atividade residual de tripsina.

O extrato de raízes também foi aquecido a 70 °C por 20 min, antes da reação com o substrato, como ocorreu com o de sementes, para eliminar o possível efeito de lectinas, que poderiam mascarar a atividade do inibidor de tripsina.

3.4 Atividade de inibidor de tripsina em folhas de *E. urophylla*

3.4.1 Obtenção do extrato protéico de folhas

As folhas recolhidas das plântulas de *E. urophylla* (cultivadas com descrito em 3.3.1) também foram utilizadas para a verificação de atividade inibitória de tripsina. Estas foram maceradas em nitrogênio líquido e ao pó formado adicionou-se 100 mL de solução salina (NaCl 15%), sendo a suspensão mantida sob agitação por 1 h e a seguir centrifugada a 12.300 *g* por 25 min. O sobrenadante recolhido foi precipitado com um volume 4 vezes maior de acetona, mantida em banho de gelo, e o material foi centrifugado a 12.300 *g* por 15 min. O precipitado protéico obtido foi ressuspenso em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e a suspensão agitada por 15 min. Após nova centrifugação a 12.300 *g* por 15 min foi recolhido o sobrenadante, o qual foi mantido em congelador até a utilização.

Figura 3 - Sistema de produção de plântulas de *Eucalyptus urophylla* no interior de tubos de ensaio contendo solução de Sarruge 50% e 0,25% de ágar, mantidos a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h. Plântulas com 45 dias após o transplante.

Figura 4 - Detalhe de uma plântula de *Eucalyptus urophylla* com 45 dias após o transplante, cultivada em tubo de ensaio contendo solução de Sarruge 50% e 0,25% de ágar, mantido a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h.

Figura 5 - Detalhe das raízes de uma plântula de *Eucalyptus urophylla*, 45 dias após o transplante, produzida em tubo de ensaio com solução de Sarruge 50% e 0,25% de ágar, mantido a 28 °C, sob fotoperíodo 12/12 h.

3.4.2 Teste para atividade de tripsina em folhas

A atividade de inibidor de tripsina presente em folhas de *E. urophylla* foi verificada apenas para as frações obtidas através da cromatografia de exclusão molecular, a partir do extrato bruto.

3.5 Purificação parcial dos extratos de sementes, raízes e folhas por cromatografia líquida de exclusão molecular

A cromatografia foi realizada para o fracionamento das proteínas totais dos extratos de sementes, raízes e folhas, bem como para o cálculo aproximado do peso molecular das mesmas. A coluna utilizada apresentava dimensões de 60 x 1,5 cm e foi preenchida com o gel Sephacryl S-100-HR (Sigma), equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). As amostras de cada extrato, aplicadas à coluna, foram de 1,5 mL, eluídas em um fluxo de 0,3 mL/min (18 mL/h), sendo cada fração coletada a cada 3,33 min. O *void volume* (V_0) da coluna foi determinado pela passagem de 1 mL de amostra de blue dextran (1 mg/mL), nas mesmas condições de fluxo e tempo.

3.5.1 Atividade de inibidor de tripsina nas frações

As frações obtidas através da cromatografia a partir dos tecidos vegetais foram utilizadas para verificação da atividade para inibidor de tripsina. Todas as frações tiveram a absorbância determinada a 280 nm, em espectrofotômetro, e uma alíquota de 50 µL de cada fração foi testada para a atividade inibitória. Estas alíquotas reagiram com 300 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e 100 µL de tripsina (100 µg/mL de HCl 1 mM). Esta mistura de reação foi incubada a 37 °C por 10 min e a seguir cada tubo recebeu 500 µL de BAPNA, para nova incubação à mesma temperatura por 40 min. A reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido acético 30% (v/v). Para cada fração, as reações foram conduzidas em duplicata e os controles, representando

100% da atividade enzimática pela ausência das frações, também foram em duplicata. Os controles para a atividade de cada fração foram representados pela adição do ácido acético antes do substrato e os valores de absorbância destes controles foram subtraídos daqueles obtidos para os tubos onde ocorreu a reação, gerando um valor que foi subtraído de 100% da atividade de tripsina, indicando a porcentagem de inibição para cada fração. Todos os tubos tiveram a absorbância determinada a 405 nm.

As frações com atividade para inibidor de tripsina foram separadas e novas alíquotas de 50 µL foram retiradas para a verificação do efeito do aquecimento sobre a capacidade inibitória. Após o aquecimento a 70 °C por 20 min estas alíquotas foram testadas para a atividade de inibidor, nas mesmas condições que aquelas não aquecidas e os valores de absorbância comparados.

O restante das frações com atividade foi conservado em congelador, para testes posteriores sobre o crescimento dos isolados de *P. tinctorius* e de *R. solani*.

3.6 Determinação da atividade de tripsina e de inibidor de tripsina em filtrado de meio de cultivo de *P. tinctorius* e de *R. solani*

3.6.1 Obtenção dos filtrados fúngicos

Os isolados compatível (1604) e incompatível (185) de *P. tinctorius* foram cultivados em meio líquido BD (batata-dextrose), por 30 dias a 28 °C, no escuro. Para cada erlenmeyer, contendo 50 mL de meio, foram transferidos 2 discos (7 mm de diâmetro) de meio BDA com micélio de cada isolado com 30 dias, sendo 5 repetições para cada isolado. Após o período de incubação, 5 mL de cada repetição foram retirados e misturados entre si, passados em papel de filtro comum (Whatman número 40) e o filtrado obtido passado em filtro Millipore 0,2 µm.

O patógeno *R. solani* foi cultivado e amostrado sob as mesmas condições anteriores, porém permaneceu 12 dias sob incubação, pois já havia recoberto a superfície do meio líquido nesse período.

3.6.2. Purificação parcial dos filtrados fúngicos por cromatografia líquida de exclusão molecular e teste para a atividade de tripsina

Os filtrados fúngicos obtidos como em 3.6.1 foram submetidos a cromatografia líquida, em coluna empacotada, equilibrada e eluída nas mesmas condições descritas em 3.5. A amostra utilizada, em cada caso, foi de 1,5 mL. Todas as frações obtidas tiveram a absorbância determinada a 280 nm, em espectrofotômetro, e uma alíquota de 300 µL de cada fração foi testada para a atividade de tripsina e outros 300 µL foram testados para a atividade de inibidor de tripsina.

Para a atividade de tripsina, 300 µL de cada fração, sem aquecimento prévio, foram incubados em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) contendo CaCl_2 0,01M e 500 µL de BAPNA 1 mM em DMSO por 40 min a 37 °C. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido acético 30% (v/v). Um controle onde não havia atividade enzimática foi feito em duplicata, no qual não houve a adição das frações e o volume de tampão foi ajustado para 500 µL. Cada tubo de reação, para cada fração, também foi feito em duplicata, assim como seus controles, que consistiram da adição do ácido acético antes do BAPNA. A diferença dos controles individuais em relação aos seus tubos de reação permitiram verificar se houve atividade em cada fração, quando comparadas ao controle geral, onde não havia atividade enzimática.

Para a atividade de inibidor de tripsina, as alíquotas de 300 µL de cada fração foram incubadas em mistura de reação, conforme descrito em 3.1.2. com um aquecimento prévio de 70 °C por 20 min.

3.7 Cálculo das massas moleculares das frações com atividade inibitória

A curva padrão (Apêndice 1) para os cálculos das massas moleculares das frações com atividade inibitória de extratos de sementes, raízes e folhas foi obtida pelo uso do kit MW-GF-70 (Sigma), com amostras de 1,5 mL de albumina de soro bovino (5

mg/mL), aprotinina (3 mg/mL), anidrase carbônica (2 mg/mL) e citocromo c (2 mg/mL), eluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), a um fluxo de 0,3 mL/min, com frações de 1 mL, coletadas a cada 3,33 min. Para a determinação do V_o (*void volume*), foram utilizados 1,5 mL de *blue dextran* (1 mg/mL), dissolvido no tampão de equilíbrio. A curva padrão foi calculada pelas razões V_e/V_o correspondentes a cada peso molecular conhecido das proteínas padrões, onde V_e representa o volume de eluição, ou seja, o pico de eluição de cada proteína. Os pesos moleculares para as frações com atividade inibitória foram calculados pela interpolação dos valores de V_e/V_o na curva padrão, após a cromatografia das amostras de sementes, raízes e folhas.

3.8. Efeito de frações do extrato de sementes, com atividade de inibidor de tripsina, sobre o crescimento *in vitro* dos isolados de *P. tinctorius* e de *R. solani*

As frações obtidas a partir da cromatografia do extrato de sementes, que apresentavam inibição da atividade de tripsina superior a 50 %, foram reunidas e após o cálculo de proteínas totais pelo método de Bradford foram utilizadas para um bioensaio com os isolados de *P. tinctorius* e de *R. solani*.

Os procedimentos adotados para o cultivo, tempo de incubação e incorporação das frações protéicas com atividade ao meio de cultura foram idênticos aos do item 3.2, com variação das quantidades de proteína utilizadas em cada tratamento. Houve um controle, sem adição das frações, e mais quatro tratamentos contendo o equivalente a 1, 3, 7, 15 e 20 µg de proteína por placa de 5 cm de diâmetro, com volume final de meio de 7 mL. O experimento constou de 3 repetições para tratamentos e controle, sendo repetido uma vez.

3.9 Cálculo da concentração de proteínas nos extratos brutos e nas frações

A dosagem de proteínas totais nos extratos brutos de sementes, raízes e folhas e em suas respectivas frações, obtidas por meio de cromatografia líquida, com

atividade de inibidor de tripsina foi feita segundo metodologia proposta por Bradford, onde a cada 0,8 mL de amostra foram adicionados, sob agitação, 0,2 mL de reagente concentrado de Bradford. Após 5 min de incubação, à temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm, tendo como referência a reação de 0,8 mL de água destilada com 0,2 mL do reagente. A curva padrão (Apêndice 2) foi construída com albumina de soro bovino (ABS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade de inibidores de proteases no extrato bruto de sementes

Os testes para a atividade de proteases no extrato bruto de sementes de *E. urophylla* revelaram a existência de tripsina e papaína, não sendo verificada atividade de quimotripsina. A ausência de quimotripsina, após a confirmação de tripsina no extrato, já era esperada, pois estas duas proteases comumente não aparecem associadas (Laskowski & Kato, 1980).

A curva de atividade residual de tripsina (Figura 6 - A) apresenta uma inibição ao redor de 70% de sua atividade total e aquela para papaína (Figura 6 - B) mostra, aproximadamente, 90% de inibição. A presença desses inibidores de proteases com alta capacidade inibitória, em sementes da espécie estudada, permite aceitar a hipótese de que atuem como parte dos mecanismos de defesa da planta, contra o ataque de insetos predadores, pela paralisação de seus processos digestivos, além de regularem endogenamente a proteólise celular (Richardson, 1991). Como podem ser encontrados nos vacúolos, paredes celulares, espaços intercelulares e no citoplasma, podem retardar ou prevenir a invasão dos tecidos das sementes por microorganismos saprófitas ou parasitas (Richardson, 1991).

4.2 Efeito do extrato bruto de sementes sobre o crescimento micelial *in vitro* de *P. tinctorius* e de *R. solani*

Após a constatação da atividade de inibidores de tripsina e de papaína no extrato de sementes de *E. urophylla*, o biensaio testando a influência dessas proteínas sobre os isolados compatível e incompatível de *P. tinctorius* e sobre um isolado do patógeno *R. solani* apresentou resultados que serviram de incentivo às pesquisas subsequentes. Entre os isolados do fungo ectomicorrízico, o compatível 1604 (Figura 7 - A) cessou seu crescimento em presença das duas doses de proteínas adicionadas ao meio de cultivo, indicando sua alta sensibilidade ao extrato de sementes, e o incompatível 185 (Figura 7 - B), embora menos sensível, apresentou um crescimento ao redor de 50% em relação ao controle, para as mesmas concentrações de proteínas. Já o patógeno *R. solani* não demonstrou qualquer sensibilidade aos mesmos tratamentos, não alterando seu padrão normal de crescimento (Figura 8). As Figuras 9 e 10 apresentam o resultado final do crescimento micelial dos fungos testados em placas de Petri, como ilustração dos valores apresentados graficamente.

Os resultados mostraram existir forte influência do extrato de sementes de *E. urophylla* sobre o desenvolvimento de isolados do fungo simbiote, mas esta ainda não poderia ser atribuída aos inibidores de proteases, devido à utilização do extrato bruto para o bioensaio. Para se comprovar o efeito fungistático observado nas placas, os discos de micélio de *P. tinctorius*, aos quais se aplicou o extrato protéico, foram transferidos para meio BDA e incubados sob as mesmas condições do ensaio inicial. A partir do quarto dia de incubação, houve retomada do crescimento normal do fungo.

Figura 6 - Inibição das atividades de tripsina (**A**) e papaína (**B**) pelo extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*. Hidrólise de BAPNA 1mM por tripsina bovina (10 mg) e papaína (10 mg), em pH 8,0 a 37 °C, em presença de doses crescentes do extrato.

Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações de proteína do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* sobre o crescimento micelial *in vitro* do isolado 1604 (compatível) de *Pisolithus tinctorius*, durante 12 dias de incubação (A), e do isolado 185 (incompatível), durante 9 dias de incubação (B), em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=21 µg; ▲=47 µg. As barras representam as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de proteína do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, durante 3 dias de incubação, em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=21 µg; ▲=47 µg. As barras representam as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 9 - Aspecto das colônias do isolado 1604 (compatível - **A**) de *Pisolithus tinctorius* e do isolado 185 (incompatível - **B**), após 9 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (placas da esquerda) ou na presença de extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* equivalente a 21 e 47 µg de proteína/placa.

Figura 10 - Aspecto das colônias de *Rhizoctonia solani*, após 3 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (placa da esquerda) ou na presença de extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla* equivalente a 21 e 47 μg de proteína/placa.

4.3 Atividade de inibidor de tripsina no extrato bruto de raízes

Embora tenham sido verificadas atividades de dois tipos de inibidores, o de uma serino-protease (tripsina) e o de uma cisteíno-protease (papaína), houve a opção da continuidade dos estudos apenas com o inibidor de tripsina, por ser a protease sobre a qual se concentra a maioria das pesquisas (Richardson, 1991) e, também, devido ao longo período de tempo dispensado durante a presente pesquisa à adaptação das metodologias existentes para inibidores de proteases de outros vegetais, para o caso de sementes, raízes e folhas de eucalipto, para o qual não existiam estudos anteriores na área.

A atividade de inibidor de tripsina foi verificada para raízes de *E. urophylla*, inibindo ao redor de 80% da atividade desta protease, nas condições do ensaio (Figura 11). Este resultado permite a consideração de que o inibidor presente constitutivamente nas raízes da planta possa apresentar papéis fisiológicos semelhantes àqueles já descritos para o caso das sementes (Ryan, 1973; Richardson, 1991). Ainda, serviu como importante embasamento para os resultados obtidos a partir dos bioensaios utilizando extrato e frações de sementes, uma vez que o local de ação dos fungos estudados, as raízes, mostraram conter o mesmo tipo de inibidor de protease que o encontrado em sementes da mesma planta.

Figura 11 - Inibição da atividade de tripsina pelo extrato proteico bruto de raízes de *Eucalyptus urophylla*. Hidrólise de BAPNA 1mM por tripsina bovina (10 mg), em pH 8,0 a 37 °C, em presença de doses crescentes do extrato.

4.4 Atividade de inibidor de tripsina presente em frações de proteínas de sementes, raízes e folhas obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular

As frações obtidas através da cromatografia líquida usando Sephacryl S-100-HR, a partir dos extratos de sementes, raízes e folhas de *E. urophylla*, tiveram seus valores de absorbância determinados a 280 nm, em espectrofotômetro, sendo que aquelas que apresentaram valores superiores a zero, indicando a presença de proteínas, foram testadas quanto à atividade para inibidor de tripsina.

As curvas de absorbância a 280 nm e de atividade residual de tripsina, em porcentagem, apresentaram padrão bastante próximo quando as três partes da planta foram comparadas (Figura 12 - A, B e C). As setas indicam, para os três casos, que o primeiro pico de absorbância a 280 nm, embora com baixa quantidade de proteína, foi o único cujas frações continham um inibidor para tripsina. Estes resultados demonstraram

que tanto a parte aérea (folhas e sementes) como as raízes de *E. urophylla* contém proteínas com função de inibidores de tripsina e que não há grande variação quanto à massa molecular (vide item 4.7) e a magnitude de atividade desses inibidores em relação à sua localização.

4.5 Atividade de tripsina e de inibidor de tripsina em filtrados de meio de cultivo dos isolados de *P. tinctorius* e de *R. solani*

Os testes para atividade de tripsina e de inibidor de tripsina com as frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular dos meios de cultivo líquido, para os isolados de *P. tinctorius* e para *R. solani*, não apresentaram resultados positivos. O fungo ectomicorrízico e o patógeno estudados não exibem a tripsina como integrante do conjunto de suas proteases, o que não exclui a liberação de outras proteases pelos mesmos. No caso de *P. tinctorius*, Dahm & Strzelczyk (1995) verificaram a atividade proteolítica em alguns isolados, embora não tenham utilizado substratos específicos para identificação da(s) protease(s) ativa(s).

Antes dos testes para atividade enzimática e do inibidor, todas as frações tiveram a absorbância determinada a 280 nm, em espectrofotômetro, e as curvas obtidas encontram-se na Figura 13. Interessante observar que, embora tratando-se de uma mesma espécie fúngica, as curvas protéicas para os dois isolados de *P. tinctorius* mostraram algumas diferenças entre si quanto aos picos de eluição e o isolado 185 (Figura 13 - B) apresentou praticamente o dobro para os valores de absorbância em relação ao isolado 1604 (Figura 13 - A). Este último resultado foi devido, provavelmente, ao crescimento micelial mais rápido e vigoroso do isolado 185 em meio de cultivo líquido, o que também se verifica ao cultivá-lo em meio sólido.

Figura 12 - Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR) do extrato protéico bruto de sementes (A), raízes (B) e folhas (C) de *Eucalyptus urophylla*. A coluna cromatográfica (60 x 1,5 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo de 18 mL/h e 50 μ L dessas frações foram incubados com o substrato BAPNA 1mM e 10 mg de tripsina bovina, em pH 8,0 a 37 °C. As setas indicam o valor de máxima inibição da atividade enzimática, correspondente ao primeiro dos possíveis picos (I, II e III) de absorbância a 280 nm (●). Atividade residual de tripsina/ μ L de fração, expressa em porcentagem (○).

Figura 13 - Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR) de filtrados de meio de cultura BD dos isolados 1604 (**A**) e 185 (**B**) de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizoctonia solani* (**C**). A coluna cromatográfica (60 x 1,5 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Frações de 1 mL foram coletadas a um fluxo de 18 mL/h. Absorbância a 280 nm (o)

4.6 Efeito de frações do extrato de sementes, com atividade inibitória de tripsina, sobre o crescimento micelial *in vitro* de isolados de *P. tinctorius* e de *R. solani*

Os resultados negativos para a atividade de tripsina por parte dos fungos inicialmente não serviram de estímulo à utilização das frações parcialmente purificadas para inibidor de tripsina, para testes subsequentes do efeito do inibidor sobre o crescimento micelial *in vitro* de *P. tinctorius* e de *R. solani*. A ausência, nos fungos, da protease específica para o inibidor encontrado na planta hospedeira não permitiu que se atribuísse ao inibidor de tripsina a responsabilidade pela inibição ou redução do crescimento dos isolados 1604 e 185 de *P. tinctorius*, quando cultivado em meio acrescido do extrato bruto de sementes (Figura 7 - A e B; Figura 9).

No entanto, um novo bioensaio foi realizado com as frações provenientes da cromatografia líquida do extrato de sementes, que apresentavam atividade inibitória de tripsina superior a 50%, e os resultados surpreenderam. Assim como para os testes realizados com o extrato bruto de sementes, as frações promoveram a inibição total do crescimento micelial do isolado 1604 de *P. tinctorius* (Figura 14 - A) em presença das duas maiores concentrações de proteína testadas (15 e 20 µg de proteína/placa), sendo que para as duas menores concentrações de proteína (1 e 3 µg de proteína/placa), não houve alteração significativa em relação ao controle, na maioria dos dias em que o crescimento foi avaliado. O Anexo A apresenta a significância estatística para os resultados referentes ao isolado 1604. O isolado 185 (Figura 14 - B), a partir do quarto dia de cultivo, apresentou curvas com tendência de crescimento semelhantes entre si para todas as concentrações de proteína testadas, porém foi nítido o atraso do crescimento quando comparado ao controle, em presença das duas concentrações mais altas, com uma inibição significativa a partir da incorporação de 7 µg de proteína/placa, observações confirmadas estatisticamente, conforme Anexo B. O patógeno *R. solani* (Figura 15 e Anexo C) também como o ocorrido no caso do extrato bruto, não demonstrou qualquer alteração de seu padrão normal de crescimento. As Figuras 16 e

17 apresentam o resultado final do crescimento dos fungos testados, em placas de Petri, ilustrando os resultados gráficos.

A semelhança entre os resultados obtidos para o crescimento micelial das espécies avaliadas, nos testes com extrato bruto de sementes e com frações parcialmente purificadas para inibidor de tripsina, podem levar a algumas considerações. O fato de *P. tinctorius* ou *R. solani* não terem apresentado atividade de tripsina extracelular, não exclui a possibilidade da presença de alguma protease necessária ao metabolismo do simbionte, que tenha um ou mais resíduos de aminoácidos com afinidade pelo sítio catalítico do inibidor, já que os dois isolados mostraram-se bastante sensíveis a concentrações crescentes de proteínas com atividade inibitória de tripsina. Esta hipótese baseia-se na informação de que os inibidores de proteases são altamente específicos quanto ao seu sítio reativo, ou seja, quanto ao peptídeo a ser clivado, mas podem inibir efetivamente diferentes enzimas dentro de uma classe (Weber, 1986).

Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações de proteína de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina, sobre o crescimento micelial *in vitro* do isolado 1604 de *Pisolithus tinctorius*, durante 12 dias (A), e do isolado 185, durante 9 dias de incubação (B), em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=1 µg; ■=3 µg; ●=7 µg; *=15 µg; ○=20 µg. As barras representam as médias $\pm$ erro padrão

Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações de proteína de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina, sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, durante 3 dias de incubação, em meio BDA a 28 °C. Concentrações de proteínas: ◆=0 µg; □=1 µg; ■=3 µg; ●=7 µg; *=15 µg; o=20 µg. As barras representam as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 16 - Aspecto das colônias do isolado 1604 (compatível - A) de *Pisolithus tinctorius*, após 12 dias de incubação, e do isolado 185 (incompatível - B), após 9 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações de proteínas (1, 3, 7, 15 e 20 µg/placa) de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina.

Figura 17 - Aspecto das colônias de *Rhizoctonia solani*, após 3 dias de incubação em meio BDA a 28 °C, no escuro, na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações de proteínas (1, 3, 7, 15 e 20 µg/placa) de frações do extrato protéico bruto de sementes de *Eucalyptus urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), com atividade de inibidor de tripsina.

Outra consideração a ser feita é sobre a diferença de sensibilidade ao inibidor de tripsina entre o simbiote e o patógeno. Embora os bioensaios tenham sido realizados com extrato proveniente de sementes de *E. urophylla*, a atividade de inibidor de tripsina também nas raízes permite inferir que alguma ação diferenciada do inibidor possa ocorrer no momento da infecção pelo simbiote ou pelo patógeno. Mesmo sem saber se a concentração do inibidor nas células de raízes, no momento da penetração fúngica, seria equivalente àquela possível de causar inibição do desenvolvimento normal de *P. tinctorius*, convém lembrar que espécies de eucalipto normalmente são colonizadas por endomicorizas e por ectomicorizas, sendo predominantemente ectomicorizadas na fase adulta (Boudarga et al., 1990; Bellei & Carvalho, 1992; Smith & Read, 1997). Pensando no caso de raízes, as utilizadas nos testes de atividade de inibidor de tripsina foram coletadas de plântulas e sua concentração do inibidor nas mesmas poderia variar em decorrência da idade da planta. Seguindo o raciocínio exposto, talvez o inibidor de tripsina da planta hospedeira pudesse fazer parte do complexo mecanismo bioquímico de reconhecimento do simbiote, até a fase adulta da planta. Porém, como estes estudos preliminares foram conduzidos apenas *in vitro*, nada de concreto se pode dizer.

Por outro lado, pode-se considerar que *R. solani* é um patógeno bastante prejudicial ao eucalipto durante sua fase jovem, ainda em viveiros, e não apresentou qualquer alteração em seu desenvolvimento, tanto em presença das frações com atividade de inibidor de tripsina como em presença do extrato protéico total da planta hospedeira. No entanto, qualquer correlação entre o inibidor e este patógeno, neste ponto, pode ser prematura, por tratar-se de um parasita necrotrófico e não específico.

Quanto a uma suposta diferença de comportamento entre os isolados compatível e incompatível de *P. tinctorius* em relação a proteínas da planta hospedeira com atividade inibitória de tripsina, os resultados obtidos não levam a crer que estes compostos possam estar associados aos fenômenos de compatibilidade ou incompatibilidade entre isolados do simbiote e *E. urophylla*. No trabalho que iniciou o estudo de proteínas ou, mais precisamente, enzimas envolvidas na interação destes dois

isolados do fungo ectomicorrízico com a mesma espécie hospedeira *in vitro*, Schwan-Estrada (1997) concluiu que as enzimas celulolíticas possivelmente estariam associadas ao maior ou menor grau de compatibilidade.

Estudos futuros, com testes do inibidor de tripsina do eucalipto, preferencialmente purificado, sobre plantas ectomicorrizadas em condições de viveiro, serão necessários para que se possa melhor entender o papel deste inibidor no mecanismo de compatibilidade entre diferentes isolados de *P. tinctorius*, bem como sobre sua possível ação diferenciada sobre as interações patogênicas ou simbióticas.

4.7 Massas moleculares das frações de sementes, raízes e folhas obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular

As massas moleculares, estimadas por curva padrão (Apêndice 1), para frações de proteínas de sementes, raízes e folhas, com atividade inibitória de tripsina, foram equivalentes a 76 KDa, pois o V_e (volume de eluição) em todos os casos pode ser considerado o mesmo.

5 CONCLUSÕES

As seguintes conclusões podem ser mencionadas em decorrência deste trabalho:

a) As sementes, folhas e raízes de *E. urophylla* apresentaram proteínas com atividade inibitória de tripsina, e estas não diferiram entre si quanto à magnitude da capacidade de inibição. Por sua vez, as sementes também apresentaram atividade de inibidor de papaína;

b) Os isolados 1604 (compatível) e o 185 (incompatível) de *P. tinctorius* mostraram-se sensíveis a concentrações crescentes de proteínas totais do extrato de sementes de *E. urophylla* e a frações destas proteínas com atividade de inibidor de tripsina, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular, chegando a ter seu crescimento micelial *in vitro* totalmente paralisado ou reduzido em até 50%, respectivamente quando comparados aos controles. O patógeno *R. solani* não mostrou qualquer alteração de seu padrão normal de crescimento micelial *in vitro*, quando em presença do extrato bruto de sementes ou de suas frações. Portanto, simbionte e patógeno comportaram-se de maneira diferenciada em relação ao inibidor de tripsina da planta hospedeira;

c) Os isolados de *P. tinctorius* e *R. solani* não apresentaram atividade de tripsina ou de inibidor de tripsina.

ANEXOS

Anexo A - Crescimento micelial do isolado 1604 de *P. tinctorius*, em presença de concentrações crescentes de frações de proteínas de sementes de *E. urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular, durante o período de 12 dias de cultivo em meio BDA a 28 °C, no escuro.

µg/prot/ placa	Dias de cultivo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,40*	0,40	0,40	0,40	1,05a	1,30 ^a	1,36a	1,81a	2,78a	3,43a	3,95a	5,00a
1	0,40	0,40	0,40	0,40	1,05a	1,25a	1,35a	1,57b	2,47a	3,20a	4,93a	4,78a
3	0,40	0,40	0,40	0,40	0,72b	1,10a	1,08b	1,32c	2,08b	2,90a	3,31a	4,47ab
7	0,40	0,40	0,40	0,40	0,50c	0,55b	0,65c	0,70d	0,75c	0,86b	0,98b	1,03c
15	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40c	0,40b	0,40d	0,40e	0,40d	0,40c	0,40c	0,40d
20	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40c	0,40b	0,40d	0,40e	0,40d	0,40c	0,40c	0,40d

*= valores representam o diâmetro da colônia (cm) e seguidos da mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05); média de 3 repetições.

Anexo B - Crescimento micelial do isolado 185 de *P. tinctorius*, em presença de concentrações crescentes de frações de proteínas de sementes de *E. urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular, durante o período de 9 dias de cultivo em meio BDA a 28 °C, no escuro.

μg/prot/ placa	Dias de cultivo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0,40*	0,40	0,40	0,70a	2,47a	2,90a	3,23a	3,95a	4,92a
1	0,40	0,40	0,40	0,73a	2,40a	2,80a	2,23a	3,77a	4,97a
3	0,40	0,40	0,40	0,70a	2,43a	2,90a	3,28a	3,55a	4,02b
7	0,40	0,40	0,40	0,62b	1,92b	2,17b	2,37b	2,92b	3,80b
15	0,40	0,40	0,40	0,40c	1,58b	1,87b	1,98b	2,42c	2,93c
20	0,40	0,40	0,40	0,40c	1,37bc	1,45c	1,57b	1,97c	2,45c

*= valores representam o diâmetro da colônia (cm) e seguidos da mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$); média de 3 repetições.

Anexo C - Crescimento micelial de *R. solani*, em presença de concentrações crescentes de frações de proteínas de sementes de *E. urophylla*, obtidas por cromatografia líquida de exclusão molecular, durante o período de 3 dias de cultivo em meio BDA a 28 °C, no escuro.

μg/prot/placa	Dias de cultivo		
	1	2	3
0	0,63a *	4,40a	5,00a
1	0,62a	4,33a	5,00a
3	0,63a	4,28a	5,00a
7	0,58a	4,68a	5,00a
15	0,60a	4,65a	5,00a
20	0,63a	4,72a	5,00a

*= valores representam o diâmetro da colônia (cm) e seguidos da mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$); média de 3 repetições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERER, R. Mycorrhizae: Ectomycorrhiza and Ectendomycorrhiza. In: BEHNKE, H.D.; LUETTGE, U.; ESSER, K.; KADEREITH, J.W.; RUNGE, M. (Ed.) **Progress in Botany**, v.54, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993, p.505-529.
- ALARCON, J.J.; MALONE, M. The influence of plant age on wound induction of proteinase inhibitors in tomato. **Physiologia Plantarum**, v.95, p.423-427, 1995.
- ALBRECHT, C.; ASSELIN, A.; PICHÉ, Y.; LAPÉYRIE, F. Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi during early colonization. **Physiology Plantarum**, v.91, p.104-110, 1994.
- APPLEBAUM, S.W.; BIRK, Y.; HARPAZ, I.; BONDI, A. Comparative studies on proteolytic enzymes of *Tenebrio molitor* L.. **Compendium of Biochemistry and Physiology**, v.11, n.1, p.85-103, 1964.
- BACH, M.; SEITZ, H.U. Elicitor-induced defense responses of a suspension-cultured woody plant (*Larix decidua*) and possible mechanisms of signal transduction. **Canadian Journal of Botany**, v.75, p.1243-1251, 1997.
- BARKER, S.J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, v.116, p.1201-1207, 1998.

- BAPTISTA, M.J. Envolvimento de exsudatos radiculares, compostos fenólicos e enzimas vegetais na compatibilidade entre isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* e plântulas de *Eucalyptus urophylla*. Piracicaba, 2000. 115 p. **Tese (Doutorado)** - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BAUREITHEL, K.; FELIX, G.; BOLLER, T. 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*. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.17931-17938, 1994.
- BELLEI, M.M.; CARVALHO, E.M. Ectomicorizas. In: CARDOSO, E.J.B.N. (Coord.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SBCS), 1992. cap. 21, p.297-319.
- BEYRLER, H. The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In: VARMA, A.K.; HOCK, B. (Ed.) **Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, p.365-390.
- BLEE, K.A.; ANDERSON, A.J. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. **Plant Physiology**, v.110, p.675-688, 1996.
- BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.189-214, 1995.
- BOUDARGA, K.; LAPEYRIE, F.; DEXHEIMER, J. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus in vitro*. **New Phytologist**, v.114, p.73-76, 1990.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROWN, A.E.; ADIKARAM, N.K.B. A role for pectinase and protease inhibitors in fungal rot development in tomato fruits. **Phytopath. Z.**, v.106, p.239-251, 1983.
- BUGBEE, W.M. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. **Phytopathology**, v.83, p.63-68, 1993.
- CAMPBELL, M.M.; ELLIS, B.E. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. I. Induction of phenylpropanoid metabolism. **Planta**, v.186, p.409-417, 1992.
- CHALOT, M.; BRUN, A. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. **FEMS Microbiological Reviews**, v.22, p.21-44, 1998.
- CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; RUSSIN, J.S.; LAX, A.R.; CLEVELAND, T.E. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α -amylase. **Phytopathology**, v.89, n.10, p.902-907, 1999.
- CHILVERS, G.A. Host range of some eucalypt mycorrhizal fungi. **Australian Journal of Botany**, v.21, p.103-111, 1973.
- CHILVERS, G.A.; DOUGLASS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v.103, p.397-402, 1986.

- CHRISTELLER, J.T.; GATEHOUSE, A.M.R.; LAING, W.A. The interaction of the elastase inhibitor, eglin C, with insect digestive endopeptidases: effect of pH on the dissociation constants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, p.103-109, 1994.
- COOPER, R.M. The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: CALLOW, J.A. (Ed.) **Biochemical Plant Pathology**. New York: Wiley, 1983. p.101-135.
- DAHM, H.; STRZELCZYK, E. Impact of vitamins on cellulolytic, pectolytic and proteolytic activity of mycorrhizal fungi. **Symbiosis**, v.18, p.233-250, 1995.
- FRANKEN, P.; GNADINGER, F. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: infection development and mRNA levels of defense-related genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.612-620, 1994.
- GALLI, M.A. Efeito de diferentes fontes de matéria orgânica no desenvolvimento de ectomicorizas em mudas de *Eucalyptus citriodora*. Piracicaba, 1996. 90p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.128, p.197-210, 1994.
- GAY, G.; ROUILLON, R.; BERNILLON, J.; FAVRE-BONVIN, J. IAA biosynthesis by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* as affected by different precursors. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p.2235-2239, 1989.

- GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **Plant Cell**, v.8, p.1871-1883, 1996.
- GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; PATANKAR, A.G.; GUPTA, V.S.; SAINANI, M.N.; DESHPANDE, V.V.; RANJEKAR, P.K. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. **Plant Pathology**, v.47, p.693-699, 1998.
- GOGALA, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. **Experientia**, v.47, p.331-340, 1991.
- GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v.175, p.776-777, 1972.
- HAHN, M.G.; BUCHELI, P.; CERVONE, F.; DOARES, S.H.; O'NEILL, R.A.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In: KOSUGE, T.; NESTER, E.W. (Ed.) **Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives**. New York: McGraw Hill, 1989. p.131-181.
- HAHN, M.G.; CHEONG, J.J.; ALBA, R.; ENKERLI, J.; COTÉ, F. Oligosaccharide elicitors: structures and recognition. In: FRITIG, B.; LEGRAND, M. (Ed.). **Mechanisms of Plant Defense Responses**. Academic Press, New York, 1993. p.99-116.
- HAM, K.S.; WU, S.C.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- β -1,3-glucanases. **Plant Journal**, v.11, n.2, p.169-179, 1997.

- HAM, W.E.; SANDSTEDT, R.M. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. **Journal of Biological Chemistry**, v.154, p.505-506, 1945.
- HAMPP, R.; SCHAEFFER, C. Mycorrhiza - carbohydrates and energy metabolism. In: VARMA, A.K.; HOCK, B. (Ed.) **Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995. p.267-296.
- HARRISON, M.J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. **Trends in Plant Science**, v.2, p.54-60, 1997.
- HARRISON, M.J.; DIXON, R.A. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal association in roots of *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.643-654, 1993.
- HARTL, P.M.; TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K.A. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor during germination. **Phytochemistry**, v.25, p.23-26, 1986.
- HEJGAARD, J.; RASMUSSEN, S.K.; BRANDT, A.; SVENDSEN, I. Sequence homology between barley endosperm protein-z and protease inhibitors of the α -1-antitrypsin family. **FEBS Letters**, v.180, p.89-94, 1985.
- JABS, T.; TSCHOPE, M.; COLLING, C.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. **Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, v.94, p.4800-4805, 1997.

- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; VISSER, B.; STIEKEMA, W.J. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. **Planta**, v.195, p.29-35, 1994.
- JOOSTEN, M.H.A.J.; VERBAKEL, H.M.; NETTEKOVEN, M.E.; Van LEEUWEN, J.; Van der VOSSSEN, R.T.M.; DE WIT, P.J.G.M. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.45-59, 1995.
- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, p.1-11, 1998.
- KAFATOS, F.C.; TARTAKOF, A.M.; LAW, J.H. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.7, p.1477-1487, 1967.
- KAPUR, R.; TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K.A. Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the mung bean (*Vigna-radiata*). **Plant Physiology**, v.91, p.106-II 2, 1989.
- KLOSE, A.A.; HILL, B.; FEVOLD, H.L. Presence of a growth inhibiting substance in raw soybeans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology* and Medicine**, v.62, p.10-12, 1946.
- KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **Plant Cell**, v.8, p.1711-1722, 1996.

- KOIDE, R.T.; SCHREINER, R.P. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.557-581, 1992.
- KOTTKE, I.; HOLOPAINEN, T.; ALANEN, E.; TURNAU, K. Deposition of nitrogen in vacuolar bodies of *Cenococcum geophilum* Fr. mycorrhizas as detected by electron energy loss spectroscopy. **New Phytologist**, v.129, p.411-416, 1995.
- KOTTKE, I.; PARGNEY, J.C.; QIAN, X.M.; LE DISQUET, I. Passage and deposition of solutes in the hyphal sheath of ectomycorrhizas - The soil-root interface. In: SANDERMANN, H.; BONNER-MASIMBERT, M. (Ed.) **EUROSILVA - Contribution to Forest Tree Physiology**. INRA Editions, Paris, France, 1995. p.255-271.
- KROPP, B.P.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal fungi of *Tsuga heterophylla*. **Mycologia**, v.74, p.479-488, 1982.
- KRUGNER, T.L. Ectomicorrizas: caracterização, produção de inóculo e inoculação. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1, Lavras, 1985. **Anais**. Lavras: FAEPE, 1986. p.138-141.
- KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças do Eucalipto. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas**, São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.358-375.
- KRUGNER, T.L.; TOMAZELLO FILHO, M. Tecnologia de inoculação micorrízica em viveiro de *Pinus* spp. Piracicaba, IPEF, 1979. 6p. (**Circular Técnica 6**).

- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General Properties. **Journal of Genetic and Physiology**, v.30, p.291-310, 1947.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Supression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.75-83, 1993.
- LASKOWSKY, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, p.593-626, 1980.
- LEGENDRE, L.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.20140-20147, 1992.
- LIGTERINK, W.; KROJ, T.; zur NIEDEN, U.; HIRT, H.; SCHEEL, D. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. **Science**, v.276, p.2054-2057, 1997.
- LIPKE, H.; FRAENCKEL, G.S.; LEINER, I.E. Growth inhibitors: effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.2, n.8, p.410-414, 1954.
- LUDWIG, A.; BOLLER, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.69, p.61-66, 1990.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. 1.

Mycorrhiza formation in model systems. **New Phytologist**, v.114, p.627-631, 1990.

MARTIN, F. ^{15}N -NMR studies of nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. **FEBS Letters**, v.182, p.350-354, 1985.

MARTIN, F.; BOTTON, B. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. **Advanced Plant Pathology**, v.9, p.83-102, 1993.

MARX, D.H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.23, p.217-223, 1977.

MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. **Canadian Journal of Botany**, v.65, p.1940-1947, 1987.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. **Plant Physiology**, v.88, p.936-942, 1988.

MENSEN, R.; HAGER, A.; SALZER, P. Elicitor-induced changes of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspension-cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins. **Physiology Plantarum**, v.102, p.539-546, 1998.

MITHOFER, A.; BHAGWAT, A.A.; FEGER, M.; EBEL, J. Suppression of fungal β -glucan-induced plant defense in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. **Planta**, v.199, p.270-275, 1996.

- MOHR, U.; LANGE, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; VOGELI-LANGE, R. Plant defense genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytologist**, v.138, p.589-598, 1998.
- MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Patterns of ectomycorrhizal specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. **Forest Science**, v.28, p.423-458, 1982.
- MOSOLOV, V.V.; LOGINOVA, M.D.; MALOVA, E.L.; BENKEN, I.I. Specific inhibitor of *Colletotrichum lindemuthianum* protease from Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Planta**, v.144, p.265-269, 1979.
- MOSOLOV, V.V.; SHULGIN, M.N. Protein inhibitors of microbial proteinases from wheat, rye and triticale. **Planta**, v.167, p.595-600, 1986.
- MUNDY, J.; HEJGAARD, J.; SVENDSEN, I. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous α -amylase and subtilisin. **FEBS Letters**, v.167, p.210-214, 1984.
- NELSON, C.E.; WALKER-SIMMONS, M.; MAKUS, D.; ZUROSKE, G.; RYAN, C.A. Regulation of synthesis and accumulation of proteinase inhibitors in leaves of wounded tomato plants. In: HEDIN, P.A. (Ed.). **Plant Resistance to Insects**. American Chemical Society, Washington, 1983. p.103-122.
- NEUHAUS, J.M.; AHL-GOY, P.; HINZ, U.; FLORES, S.; MEINS, F. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of

plants to *Cercospora nicotianae* infection. **Plant Molecular Biology**, v.16, p.141-151, 1991.

OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; GOMES, N.C.; MAIA, D.C. Infectivity and efficacy of ectomycorrhizal isolates to *Eucalyptus viminalis* Labill and *E. dunnii* Maiden. Perth, Western Australia, **The International Symposium on Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**, Programa e Abstracts, 1992.

PEARCE, G.; STRYDON, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v.253, p.895-898, 1991.

PEÑA-CORTEZ, H.; SÁNCHEZ-SERRANO J.J.; MERTENS, R.; WILLMITZER, L.; PRAT, S. Absciscic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.86, p.9851-9855, 1989.

PEÑA-CORTEZ, H.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; WILLMITZER, L. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. **Planta**, v.174, p.84-89, 1988.

PENG, J.H.; BLACK, L.L. Increased proteinase-inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, v.66, p.958-963, 1976.

PETERSON, R.L.; FARQUHAR, M.L. Mycorrhizas-integrated development between roots and fungi. **Mycologia**, v.86, p.311-326, 1994.

- PFLEGER, F.L.; STEWART, E.L.; NOYD, R.K. Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G. (Eds.) *Mycorrhizae and plant health*. APS, Minnesota, 1994, p.47-81.
- READ, J.W.; HAAS, L.H. The baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. *Cereal Chemistry*, v.15, p.59-68, 1938.
- RICHARDSON, M. Seed Storage Proteins: The Enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, v.5, p.259-305, 1991.
- RICKAUER, M.; FOURNIER, J.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiology*, v.90, p.1065-1070, 1989.
- ROBERTS, W.K.; SELITRENNIKOFF, C.P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of Genetic and Microbiology*, v.134, p.169-176, 1988.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, v.24, p.173-196, 1973.
- RYAN, C.A. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry*, v.27, p.8879-8883, 1988.
- SALZER, P.; CORBIÉRE, H.; BOLLER, T. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, v.208, p.319-325, 1999.

- SALZER, P.; HAGER, A. Effect of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall-bound proteins and enzymes of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) cells. **Trees**, v.8, p.49-55, 1993.
- SALZER, P.; HEBE, G.; HAGER, A. Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalization and H₂O₂ synthesis of *Picea abies* cells. **Planta**, v.203, p.470-479, 1997a.
- SALZER, P.; HEBE, G.; REITH, A.; ZITTERELL-HAID, B.; STRANSKY, H.; GASCHLER, K.; HAGER, A. Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce cell enzymes. **Planta**, v.198, p.118-126, 1996.
- SALZER, P.; HUBNER, B.; SIRRENBURG, A.; HAGER, A. Differential effect of purified spruce chitinases and β -1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, v.114, p.957-968, 1997b.
- SALZER, P.; MENSEN, R.; HEBE, G.; GASCHLER, K.; HAGER, A. Control of elicitor-induced reactions in spruce cells by auxin and enzymatic elicitor degradation. In: SCHENK, H.E.A.; HERRMANN, R.; JEON, K.W.; MUELLER, N.E.; SCHWEMMLER, W. (Ed.) **Eucaryotism and Symbiosis**. Springer-Verlag, Heidelberg, 1997c. p.429-440.
- SAUTER, M.; HAGER, A. The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspension-cultured cells of its host *Picea abies*. **Planta**, v.179, p.61-66, 1989.

- SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v.324, p.365-367, 1986.
- SCHMIDT, V.D.B.; OLIVEIRA, V.L.; BELLEI, M.M. Dynamics of mycorrhizal colonization in *Eucalyptus dunnii* plantations in Santa Catarina (South Brazil). Perth, Western Australia, **The International Symposium on Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**, Programa e Abstracts, 1992.
- SCHWACKE, R.; HAGER, A. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells depending on Ca^{+2} and protein kinase activity. **Planta**, v.187, p.136-141, 1992.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Caracterização enzimática de fungos ectomicorrízicos e o envolvimento de enzimas celulolíticas na simbiose *Eucalyptus urophylla-Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1997. 140p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SELOSSE, M.A.; LE TACON, F. The land flora: a phototroph-fungus partnership? **Trends in Ecological Evolution**, v.13, p.15-20, 1998.
- SIKES, A.; MAXCY, R.B. Differentiation of food bacteria on the basis of their ability to utilize different proteins. **Journal of Food Science**, v.44, p.1228-1232, 1979.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis** (2nd edition), Academic Press, London, UK, 1997.

SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, v.177, p.447-455, 1989.

STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W.J.; BOLLER, T. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. **Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, v.91, p.2196-2200, 1994.

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

TREMACOLDI, C.R.; PASCHOLATI, S.F. Produção *in vitro* de raízes de *Eucalyptus urophylla*. In: XXIII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA E VI REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, Campinas, 2000. **Resumos**. Campinas, Instituto Biológico, 2000. p.302.

VERBURG, J.G.; HUYNH, Q.K. Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.95, p.450-455, 1991.

WEDER, J.K.P. **Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Plant Foods**. FRIEDMAN, M. (Ed.). Plenum Press, New York, 1986. p.299-347.

WEISS, M.; MIKOLAJEWSKI, S.; PEIPP, H.; SCHMITT, U.; SCHMIDT, J.; WRAY, V.; STRACK, D. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.114, p.15-27, 1997.

- WESTFALL, R.J.; HAUGE, S.M. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. **Journal of Nutrition**, v.35, p.374-389, 1948.
- WOLFSON, J.L.; MURDOCK, L.L. Growth of *Manduca sexta* on wounded tomato plants: role of induced proteinase inhibitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.54, p.257-264, 1990.
- YOKOMIZO, N.K.S. Associação ectomicorrízica de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch com espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. Piracicaba, 1981. 54p. **Dissertação (M.S)** - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- YOSHIKAWA, M.; IWASAKI, T.; FUJII, M.; OOGAKI, M. Isolation and some properties of a subtilisin inhibitor from barley. **Journal of Biochemistry**, v.79, p.765-773, 1976.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Curva padrão para estimativa da massa molecular, através de cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephacryl S-100-HR), onde V_e =volume de eluição e V_o =void volume.

Apêndice 2 - Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando reagente concentrado e albumina de soro bovino.