**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ELICITORES DE
FITOALEXINAS EM SORGO (*Sorghum bicolor*) OBTIDOS A
PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae***

NELSON ARNO WULFF

Biólogo

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 1997

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

Wulff, Nelson Arno

Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo (*Sorghum bicolor*) obtidos a partir de *Saccharomyces cerevisiae* / Nelson Arno Wulff. - - Piracicaba, 1997.

62 p. : il.

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

1. Fitoalexina 2. Levedura 3. Resistência ao patógeno 4. Sorgo I. Título

CDD 581.29
633.174

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ELICITORES DE FITOALEXINAS EM
SORGO (*Sorghum bicolor*) OBTIDOS A PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae***

NELSON ARNO WULFF

Aprovada em: 27.11.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sergio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP

Prof. Dr. Helaine Carrer

ESALQ/USP

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Florentino Pascholati', with a stylized flourish at the end.

Prof. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Orientador

“Se não fossem os nós, os bambus cresceriam mais rapidamente; contudo sucumbiriam a primeira lufada de vento.

Fortalecer o nó do bambu exige tempo e energia; porém, é ele que proporciona segurança nas tempestades! ”

Provérbio Japonês

Ao meu pai Waldomiro, com
quem gostaria de compartilhar
mais esta vitória, ofereço.

À minha mãe Silphe e minha
irmã Anne, pelo apoio, incentivo
e pela minha ausência, agradeço.

À Cristina, pelo apoio, convívio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sergio F. Pascholati pela orientação e estímulo e por ter me acolhido em seu laboratório de Fisiologia do Parasitismo.

Ao Prof. Breno Leite que conduziu meus primeiros passos tanto na pesquisa científica bem como nesta área de conhecimento.

Ao Departamento de Fitopatologia (ESALQ/USP) por ter permitido que fossem conduzidos os experimentos de laboratório, bem como a utilização de sua estrutura física.

Aos colegas do departamento e em especial aos integrantes do laboratório, pelo convívio e lições aprendidas: José Renato, Márcia, Kátia, Robson, Hélio, Fabiana, Andressa, Célia, Everaldo e Thaís.

Ao Dr. Alexandre Ferreira (CNPMS/EMBRAPA - Sete Lagoas/MG) pelo fornecimento das sementes de sorgo.

A Fundação Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a dedicação integral e exclusiva para realização do curso de Mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.	i
LISTA DE TABELAS.	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.	iv
RESUMO.	v
SUMMARY.	vi
1 INTRODUÇÃO.	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.	3
2.1 Mecanismos de Defesa.	3
2.1.1 Defesas Constitutivas.	3
2.1.2 Defesas Induzíveis.	4
2.1.2.1 Fitoalexinas.	5
2.2 Reconhecimento nas Interações Planta-Patógeno.	7
2.2.1 Elicitores.	7
2.2.2 Supressores.	10
2.2.3 Receptores e Transdução de Sinais.	11
2.3 Indução de Resistência.	12
2.4 Controle Biológico.	14
2.5 Componentes Estruturais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3 METODOLOGIA.	17
3.1 Material Vegetal.	17
3.2 Bioensaio para Produção de Fitoalexinas em Mesocótilos de Sorgo.	17

3.3 Determinação da Concentração de Proteínas e Carboidratos	18
3.4 Preparações Elicitoras.	18
3.5 Precipitação Etanólica.	20
3.6 Separação das Frações Ativas por Cromatografia de Coluna	20
3.6.1 Cromatografia de Troca Iônica (CTI).	20
3.6.2 Cromatografia de Filtração em Gel (CFG).	21
3.7 Ensaio com Amostras sem Atividade Elicitora.	22
3.8 Tratamento das Amostras com Proteinase K.	22
4 RESULTADOS.	23
4.1 Acúmulo de Fitoalexinas	23
4.2 Fracionamento dos Componentes Elicitores-Ativos a Partir de <i>S. cerevisiae</i> . .	23
4.3 Acúmulo de Fitoalexinas em Resposta a Concentrações Variáveis de Proteínas nas Amostras Filtradas e no Sobrenadante de Precipitação Etanólica	26
4.4 Cromatografia de Coluna	28
4.5 Tratamento Enzimático	32
5 DISCUSSÃO.	35
6 CONCLUSÕES.	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	44
APÊNDICE.	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema do procedimento para a obtenção de amostras de células autoclavadas ou não, a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e seus filtrados (Roveratti, 1989)	19
2 Mesocótilos de sorgo incubados em água (a), com a preparação elicitora bruta obtida de <i>S. cerevisiae</i> (b) ou com a fração 'supressora' (c). Fotografia obtida 60 h após tratamento. Barra corresponde a 1 cm.	24
3 Espectro de absorbância do extrato metanólico obtido de mesocótilos de sorgo tratados com a preparação elicitora de <i>S. cerevisiae</i> (a) ou com água (b). Extrato metanólico obtido de mesocótilos, 60 h após o tratamento elicitor. . . .	24
4 Teores de proteínas e carboidratos das preparações filtradas obtidas de <i>S. cerevisiae</i> (20 mg mL ⁻¹). Números entre parênteses referem-se às preparações da Figura 1	26
5 Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo mediante tratamento com filtrado de suspensão de células (—■—) ou filtrado de células autoclavadas (—□—).	27

- 6 Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo mediante tratamento com preparação elicitora bruta (sobrenadante de precipitação etanólica) obtida de *S. cerevisiae* 27
- 7 Cromatografia de troca iônica da preparação elicitora bruta obtida de *S. cerevisiae*. Uma amostra de 70 mL (57 mg proteína e 18,5 mg de carboidrato) foi aplicada na resina (5 x 6 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0 e eluída. Gradiente linear de NaCl foi aplicado no mesmo tampão. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (—●—) foi determinada em 280 nm e carboidratos (—) pelo método de Lever (1972). Concentrações molares de NaCl do eluente (—○—) foram determinadas indiretamente por condutividade. Colunas representam média de 3 amostras de um experimento representativo $\pm$ erro padrão da média. Letras **a**, **b** e **c** representam frações reunidas para CFG (item 3.6.2) 29
- 8 Cromatografia de filtração em gel das frações adsorvidas em DEAE-Celulose. (a) Amostra de 1 mL das frações 134 a 150 (**Figura 7**); (b) Amostra de 1 mL das frações 151 a 167; (c) Amostra de 1 mL das frações 168 a 184. Amostras preparadas como descrito em 3.6.2 e aplicadas em Sephacryl (Sigma) S-100-HR (1 x 58 cm) e eluídas com água destilada. Fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Frações coletadas de 1 mL. Conteúdo de proteínas monitorado em 280 nm. Colunas representam média de 3 amostras de um experimento representativo $\pm$ erro padrão da média 31

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo mediante tratamento com preparações de <i>S. cerevisiae</i> e seus filtrados, autoclavados ou não.....	25
2 Competição entre frações sem atividade elicitora ('supressor') e preparação elicitora bruta obtidas de <i>S. cerevisiae</i> [†]	30
3 Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo após tratamento enzimático com proteinase das frações elicitoras mais ativas (elictor) provenientes da cromatografia de filtração em gel, obtidas de <i>S. cerevisiae</i> [†]	32
4 Teores de proteínas e carboidratos das frações reunidas, provenientes da cromatografia de filtração em gel [†] (Figura 8).....	33
5 Atividade elicitora específica (AEE) das preparações elicitoras obtidas a partir de <i>S. cerevisiae</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS

A ₂₈₀	Absorbância no comprimento de onda de 280 nanômetros
A ₄₈₀ gtf ⁻¹	Absorbância a 480 nm por grama de tecido fresco
AEE	Atividade elicitora específica
Avr	Avirulência
CFG	Cromatografia de filtração em gel
CTI	Cromatografia de troca iônica
DEAE	Dietilaminoetil
FAL	Fenilalanina amônia-liase
HCN	Cianeto de hidrogênio
PEG	Polietilenoglicol
R	Resistência
RH	Resposta de hipersensibilidade
RSA	Resistência sistêmica adquirida
S	Siemens
SDS	Sódio dodecil sulfato
TMV	Vírus do mosaico do fumo
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
Ve	Volume eluído (fração com maior absorbância dentro de um pico)
Vo	Volume vazio da coluna de Sephacryl S-100-HR

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ELICITORES DE FITOALEXINAS
EM SORGO (*Sorghum bicolor*) OBTIDOS A PARTIR DE *Saccharomyces
cerevisiae***

Autor: NELSON ARNO WULFF

Orientador: Prof. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

Em sorgo são sintetizadas quatro fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas em resposta a tentativa de penetração fúngica e ao tratamento com elicitores. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* estimula o acúmulo de fitoalexinas e tem potencial para ser utilizada como agente de controle alternativo no tratamento de doenças fúngicas em sorgo. Descrevemos aqui metodologia para a obtenção de elicitores glicoproteicos a partir da levedura *S. cerevisiae*, os quais estimulam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. As frações purificadas são resistentes a autoclavagem, solúveis em etanol 50 %, ligam-se a resina aniônica DEAE-Celulose e o tratamento com proteinase reduz a atividade elicitora. Além das moléculas elicitoras, foram fracionadas moléculas que possuem a capacidade de suprimir o acúmulo de fitoalexinas pelas moléculas elicitoras.

Com base nos resultados apresentados, sugere-se que moléculas possivelmente de natureza glicoproteica, oriundas da parede celular da levedura, atuem como elicitores de fitoalexinas em sorgo. Ressalta-se que da mesma forma que poucas fitoalexinas foram estudadas em monocotiledôneas, poucos são os elicitores caracterizados a apresentar atividade entre as monocotiledôneas, especialmente nas Poaceae.

**PARTIAL CHARACTERIZATION OF ELICITORS OF PHYTOALEXINS
IN SORGHUM (*Sorghum bicolor*) OBTAINED FROM *Saccharomyces
cerevisiae***

Author: NELSON ARNO WULFF

Adviser: Prof. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

Sorghum produces a complex of pigmented 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins in response to either attempted fungal penetration or elicitor treatment. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* elicits phytoalexin accumulation and is a potential biological agent for control of fungal diseases in sorghum. The present investigation establishes a procedure to purify elicitor molecules from cells of *S. cerevisiae*, which cause phytoalexin accumulation in sorghum mesocotyls. In addition to elicitor molecules, suppressor molecules of the same response were fractionated. The elicitor molecules are stable after autoclaving, soluble in ethanol 50 %, adsorb to the anion exchanger DEAE-Cellulose and proteinase treatment reduces their activities. These elicitors molecules, probably glycoproteins from *S. cerevisiae* cell walls, are one of the few to exhibit elicitor activity in monocotyledons, specially on Poaceae.

1 INTRODUÇÃO

As interações planta-patógeno envolvem uma intrincada relação entre os mecanismos de defesa vegetais e os mecanismos de patogenicidade dos microrganismos (Isaac, 1992). A ocorrência de doença denota interação compatível entre os componentes do patossistema, ao passo que a interação incompatível resulta em hospedeiro potencialmente livre de doença. Os mecanismos envolvidos na resistência de plantas aos patógenos são didaticamente divididos em dois grupos, tendo como parâmetro a chegada de propágulos do patógeno: os mecanismos de resistência pré-formados ou constitutivos e os induzíveis ou pós-formados. Entre as defesas do hospedeiro, encontram-se barreiras físicas à entrada do patógeno, bem como defesas denominadas bioquímicas. Ambas atuam sinergisticamente para evitar o sucesso na infecção e colonização do tecido hospedeiro pelo patógeno (Agrios, 1997; Pascholati & Leite, 1995).

Uma forma de defesa induzível amplamente estudada são as fitoalexinas, as quais constituem mecanismo de defesa eficiente em diversas interações planta-patógeno (Kuc, 1995; Mansfield, 1982; Smith, 1996). As fitoalexinas apresentam natureza química variada, são antibióticos com baixa especificidade e seu modo de ação inclui diversos efeitos citológicos que culminam na inibição do crescimento ou morte do patógeno (Smith, 1982; Smith, 1996).

A síntese e o acúmulo de fitoalexinas, assim como a ativação de outras respostas de defesa, ocorre em resposta a um estímulo, ou seja, ao reconhecimento de moléculas elicitoras (Hahn, 1996; Smith, 1996). Elicitores apresentam natureza química variável e têm sido purificados a partir de fungos, bactérias, vírus e vegetais, sendo

efetivos quanto a ativação de diversos mecanismos de defesa. Quando purificados a partir de patógenos podem ser ativos em plantas hospedeiras bem como em não hospedeiras.

Adicionalmente às moléculas elicitoras, as quais são reconhecidas pela planta resultando na ativação de mecanismos de defesa, as interações planta-patógeno podem envolver outras moléculas denominadas supressores. Os supressores, ao contrário dos elicitores, inibem ou retardam a resposta de defesa vegetal, podendo atuar como indutores de suscetibilidade ou acessibilidade da planta ao patógeno, tornando o vegetal suscetível a microrganismos virulentos bem como aos avirulentos (Shiraishi et al., 1997).

A ativação de mecanismos de resistência não ocorre somente com a presença do patógeno em potencial, mas também com microrganismos não patogênicos, bem como fatores abióticos que podem ativar ou induzir os mecanismos de resistência (Kessmann et al., 1994a; Kessmann et al., 1994b; Pascholati & Leite, 1995). Assim, a resistência induzida em plantas, representa uma forma alternativa de controlar doenças de plantas, e tem sido efetiva tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (Schneider et al., 1996).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada como potencial agente controlador de doenças em plantas e embora pouco seja conhecido sobre a forma de controle, é efetivo em monocotiledôneas bem como em dicotiledôneas, contra patógenos fúngico e bacterianos (Lopez, 1991; Piccinin, 1995; Roveratti, 1989; Silva & Pascholati, 1992; Stangarlin & Pascholati, 1994).

A aplicação de *S. cerevisiae* em mesocótilos de sorgo estimula a produção de fitoalexinas (Freitas et al., 1993; Roncatto & Pascholati, 1993) e a aplicação em folhas confere proteção contra patógenos fúngicos (Lopez, 1991; Piccinin, 1995). Desta forma, partindo da levedura *S. cerevisiae*, objetivou-se isolar e caracterizar os fatores com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos de Defesa

As plantas estão naturalmente expostas a um número incalculável de microrganismos, entretanto a ocorrência de doença, ou seja, a suscetibilidade aos agentes fitopatogênicos mostra-se como exceção (Pascholati & Leite, 1995). A resistência, caracterizada por sua natureza dinâmica e coordenada, mostra-se como um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (Pascholati & Leite, 1995). Estes mecanismos, também denominados de fatores de resistência, são didaticamente divididos em duas categorias: pré-formados (passivos ou constitutivos) e pós-formados (ativos ou induzíveis). Em ambas categorias, os fatores podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos, dependendo do modo primário de atuação sobre o patógeno (Agrios, 1997; Isaac, 1992; Pascholati & Leite, 1995).

2.1.1 Defesas Constitutivas

Englobam os mecanismos de defesa presentes nas plantas antes do contato com o patógeno. Citam-se as estruturas existentes nas plantas e os compostos que exibem atividade antimicrobiana intrínseca, ou após conversão em substâncias altamente tóxicas (Pascholati & Leite, 1995). Podem ser citadas as estruturas encontradas na superfície das plantas, como cutícula, tricomas, estômatos, bem como fibras ou vasos condutores. Inúmeras substâncias presentes nos vegetais, podem estar envolvidos na resistência, como fenóis, alcalóides, lactonas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos

cianogênicos, inibidores protéicos, enzimas (β -1,3-glucanases e quitinases) entre outros (Pascholati & Leite, 1995).

Em sorgo é observada resistência em todos os cultivares até aproximadamente 30 dias após germinação (Ferreira & Warren, 1982), provavelmente devido à função protetora do cianeto de hidrogênio (HCN), que pode ser produzido pela hidrólise de um glicosídeo cianogênico, o composto pré-formado durina (Myers & Fry, 1978a). Segundo Osbourn (1996), os tecidos sadios de plantas cianogênicas não contém HCN detectável, provavelmente pela compartimentalização existente entre os glicosídeos cianogênicos e as enzimas catalisadoras da liberação de HCN. Estes componentes entram em contato após liberação mediante estresse físico, químico ou biológico, tal como uma planta doente (Myers & Fry, 1978b).

2.1.2 Defesas Induzíveis

Estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidas em resposta à presença do patógeno (Pascholati & Leite, 1995). Estruturas de defesa podem ser formadas ao nível celular ou histológico, destacando-se a formação de halos, papilas e lignificação, bem como a formação de camadas de cortiça, camada de abscisão e tiloses. Como fator de resistência bioquímico podemos considerar a síntese de fitoalexinas (Pascholati & Leite, 1995).

Cumpramos ressaltar que a resistência é o resultado de um conjunto de eventos que ocorrem de forma harmoniosa nas plantas e nada impede que mecanismos de defesa considerados como constitutivos, venham a ser sintetizados e acumulados na interação planta-patógeno, respondendo pelo fenótipo resistência (Stangarlin, 1995).

Em muitos casos, o fator responsável pela ocorrência ou não de resistência à determinado patógeno não é somente a extensão ou amplitude da resposta de defesa, mas a velocidade pelo qual as respostas são ativadas e o produto formado é acumulado (Bailey & Mansfield, 1982; Smith, 1996).

2.1.2.1 Fitoalexinas

As fitoalexinas foram amplamente estudadas na década de 70 e em um simpósio sobre Mecanismos de Defesa Ativos em Plantas (“NATO Advanced Study Institute”), formou-se um consenso a respeito da definição de fitoalexinas. Estes compostos são definidos como “compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sintetizados e acumulados nas plantas após o contato com microrganismos” (Paxton, 1981, p.109; VanEtten et al., 1994). As fitoalexinas englobam diversas classes de produtos naturais (Ebel, 1986) e seu papel na resistência a patógenos é amplamente estudado (Bailey & Mansfield, 1982; Elliston et al., 1977; Kuc, 1995). Mais de 300 fitoalexinas foram caracterizadas entre diferentes classes de compostos químicos como benzofurano, cumarina, dihidrofenantreno, diterpeno, flavonóide, furanoacetileno, isocumarina, isoflavonóide, poliacetileno, pterocarpano, sesquiterpeno, estilbeno e triterpeno, tendo sido identificadas em mais de 20 famílias de vegetais superiores (Smith, 1996). Frequentemente mais de uma fitoalexina é sintetizada pela planta em uma dada interação e em tais casos as fitoalexinas são usualmente relacionadas biossinteticamente (Smith, 1996). As fitoalexinas podem ser classificadas como produtos secundários do metabolismo vegetal e há uma forte tendência em espécies relacionadas na produção de um mesmo tipo de fitoalexina (Smith, 1996). É o que se observa em sorgo, que em resposta a inoculação com fungos patogênicos ou não, produz diversos compostos fenólicos, incluindo quatro fitoalexinas derivadas de antocianidinas (Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1996; Nicholson et al., 1987). Em cana-de-açúcar, também uma gramínea, foi encontrada luteolinidina (uma deoxiantocianidina), a qual atua como inibidora de crescimento fúngico, embora seu papel na resistência não tenha sido estudado (Godshall & Lonergan, 1987).

O espectro tóxico das fitoalexinas é grande, agindo sobre fungos, bactérias, vírus, células vegetais e animais, sendo ativas em concentrações da ordem de 10^{-5} a 10^{-4} M (Smith, 1982; Ebel, 1986). O modo de ação, em geral estudado sobre fungos, inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, rompimento da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas (Smith, 1982; Smith,

1996). Estes efeitos citológicos, refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo, bem como na redução ou inibição do crescimento micelial (Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1996; Nicholson et al., 1987; Smith, 1982; Smith, 1996).

Em sorgo são conhecidas quatro fitoalexinas (flavonóides 3-deoxiantocianidinas): luteolinidina, apigeninidina, éster do ácido cafeico de arabinosil 5-*O*-apigeninidina e 5-metoxi-luteolinidina (Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1996; Nicholson et al., 1987), as quais são sintetizadas em resposta a tentativa de penetração fúngica (Nicholson et al., 1987; Snyder & Nicholson, 1990), ao tratamento com elicitor biótico (Yamaoka et al., 1990), agentes abióticos (Freitas et al., 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (Freitas et al., 1993; Roncatto & Pascholati, 1993) ou fermento (Lopez & Pascholati, 1992). Estas fitoalexinas são sintetizadas em mesocótilos (Nicholson et al., 1987) e folíolos (Nicholson et al., 1988), cerca de 3 h após a tentativa de penetração fúngica. São sintetizadas na epiderme e hipoderme (Nicholson et al., 1988; Snyder et al., 1991) e estão presentes em inclusões (Snyder et al., 1991), nas quais atingem concentrações de até 0,15 M (Snyder et al., 1991). São no entanto, fungitóxicas a patógenos e não patógenos em concentrações menores que 10 μ M (Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1996). Em folíolos, o acúmulo é restrito a uma pequena área na epiderme (Nicholson et al., 1988; Snyder & Nicholson, 1990; Snyder et al., 1991), enquanto que em mesocótilos formam-se grandes lesões ao longo do sítio de infecção, com inclusões de coloração laranja-marron a avermelhadas (Nicholson et al., 1987). A síntese das fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja, envolve aumentos nos níveis de RNAm para a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), indicando ativação gênica e envolvimento da síntese de compostos fenólicos regulados pela FAL no acúmulo destas fitoalexinas (Orczyk, et al., 1996; Weiergang et al., 1996; Yoshikawa, 1995).

Enquanto as fitoalexinas representam um mecanismo de defesa difundido nas dicotiledôneas, as mesmas não são numerosas em monocotiledôneas, como é o caso do sorgo, uma Poaceae (Ebel, 1986; Lo et al., 1996; Nicholson et al., 1987). As fitoalexinas, juntamente com o composto cianogênico durina, podem ser os responsáveis pela resistência observada em plantas jovens de sorgo (até $\pm$ 30 dias após germinação)

presente em todos os cultivares (Ferreira & Warren, 1982; Nicholson et al., 1987; Nicholson et al., 1988). Embora esta questão ainda esteja em aberto, deve ser levado em consideração o papel das fitoalexinas na resistência observada em plantas jovens de sorgo, pois as fitoalexinas sintetizadas são tóxicas ao fungo *Colletotrichum sublineolum* (antes denominado de *C. graminicola*), patógeno de sorgo. A destoxificação de fitoalexinas pode ser um meio pelo qual microrganismos superam uma defesa induzível no vegetal (VanEtten et al., 1995). Entretanto, a destoxificação de compostos pré-formados, também pode capacitar microrganismos a colonizar o tecido do hospedeiro. Segundo Fry & Evans (1977), o fungo patogênico a sorgo *Gloeocercospora sorghi* é habil em destoxificar o composto durina.

2.2 Reconhecimento nas Interações Planta-Patógeno

2.2.1 Elicitores

O termo elicitores foi originalmente proposto por Keen (1975) para denominar moléculas que estimulam a síntese de fitoalexinas, porém atualmente são considerados como elicitores, moléculas (fatores) que estimulam uma de qualquer resposta de defesa nas plantas (Ebel, 1986; Hahn, 1996; Smith, 1996). Elicitores podem ser purificados a partir de microrganismos (Ayers et al., 1976; Gustine et al., 1995; Okinaka et al., 1995; Schaffrath et al., 1995), bem como a partir da planta, sendo então denominados de endógenos (Davis et al., 1986; Hahn et al., 1981).

Os elicitores bióticos apresentam variada natureza química, sendo que já foram purificados carboidratos (oligossacarídeos) (Ayers et al., 1976; Okinaka et al., 1995), glicoproteínas (Basse & Boller, 1992; De Witt & Roseboom, 1980; Farmer & Helgeson, 1987; Parker et al., 1991; Roby et al., 1985; Schaffrath et al., 1995), proteínas (Gustine et al., 1995; Ricci et al., 1989), oligopeptídeos (Hahlbrock et al., 1995; Nürnberger et al. 1994), ácidos graxos (Bostock et al., 1981) e componentes da parede celular vegetal (Davis et al., 1986; Hahn et al., 1981). Extrato comercial de levedura (autolisado), tem servido como fonte para a purificação e caracterização de elicitores

glicoproteico (Basse & Boller, 1992) e oligossacarídico (Hahn & Albersheim, 1978), ou tem sido utilizado como preparação elicitora bruta (Lyon et al., 1995). Além dos elicitores de origem biótica, sais de metais pesados, luz ultravioleta e detergentes ativam as respostas de defesa, sendo conhecidos como elicitores abióticos (Downum, 1992; Ebel, 1986; Smith, 1996).

A variação na natureza química dos elicitores demonstra que não há uma característica estrutural única, que possa ser considerada como determinante da atividade elicitora (Smith, 1996). Porém, as características estruturais são importantes no reconhecimento dos elicitores pela planta e pequenas variações na sua estrutura interferem profundamente na atividade biológica. Entre oito isômeros do heptaglicosídeo isolado das paredes miceliais de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, somente um foi ativo como elicitor da fitoalexina gliceolina em soja (Sharp et al., 1984). A partir de uma glicoproteína elicitora de 42 kDa (purificada de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*) a menor porção ativa como elicitor consiste de uma sequência de 13 aminoácidos, enquanto que produtos do mesmo gene após deleção, não apresentaram atividade elicitora (Nürnberger et al., 1994).

Elicitores também foram purificados a partir de patógenos que seguem o modelo gene-a-gene (Bent, 1996). De acordo com a teoria de Flor (Flor, 1955), os patógenos possuem genes de avirulência-*Avr* (ou virulência, dependendo da forma alélica) enquanto as plantas possuem genes de resistência-*R*. Na interação planta-patógeno, esta complementaridade gene-a-gene reflete-se hipoteticamente, na interação de um elicitor com um receptor (Gabriel & Rolfe, 1990; Keen, 1990). Por exemplo, do fungo *Cladosporium fulvum*, foram purificados os produtos dos genes *Avr4* e *Avr9*, os quais induzem resposta de hipersensibilidade (RH) em plantas de tomate com os genes de resistência complementares *Cf4* e *Cf9*, respectivamente (Joosten et al., 1997; Van den Ackerveken et al., 1992).

Entre as respostas de defesa ativadas, encontram-se a síntese de fitoalexinas (Ayers et al., 1976; De Witt & Roseboom, 1980; Farmer & Helgeson, 1987; Okinaka, 1995; Parker et al., 1991; Yamaoka et al., 1990), proteínas relacionadas a

patogênese (Hahn et al., 1993), RH e necrose (Gustine et al., 1995; Ricci et al., 1989), explosão oxidativa - produção de espécies reativas de oxigênio - (Hahlbrock et al., 1995; Rustérucci et al., 1996), produção de proteínas ricas em hidroxiprolina (Roby et al., 1985) e deposição de lignina (Schaffrath et al., 1995).

A ativação dos mecanismos de defesa pelos elicitores pode ocorrer também de uma maneira sinérgica, onde a resposta pode sofrer uma magnificação pela atuação de dois fatores ou moléculas, oriundas do patógeno bem como de células vegetais (Dixon & Lamb, 1990; Davis et al., 1986).

Elicitores podem resultar da atividade enzimática oriunda da planta ou do patógeno. Tecidos de soja contém β -1,3-endoglucanase constitutiva, que em contato com as paredes miceliais de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, libera mediante hidrólise enzimática carboidratos solúveis, altamente ativos como elicitores de gliceolina (Okinaka et al., 1995; Yoshikawa, 1995). As enzimas endoliase do ácido poligalacturônico produzida por *Erwinia carotovora* e endopoligalacturonase produzida por *Rhizopus stolonifer*, são exemplos cuja atividade catalítica produz monômeros que são reconhecidos pelo vegetal e que ativam respostas de defesa (Davis et al., 1984; Lee & West, 1981). Assim, é a habilidade destas enzimas em degradar polissacarídeos pécticos do hospedeiro que confere seu papel na patogênese (Collmer & Keen, 1986), enquanto a mesma atividade é responsável pela produção de elicitores do acúmulo de fitoalexinas (Alghisi & Favaron, 1995).

Alguns elicitores, através da ativação de resposta(s) de defesa(s), podem atuar como indutores de resistência. O elicitor purificado de *Pyricularia oryzae* induz lignificação com redução significativa dos sintomas ocasionados pelo patógeno. Sintomas da interação compatível, os quais caracterizam-se por lesões grandes, aparecem como pequenas necroses, características da interação incompatível se o elicitor for aplicado anteriormente ao patógeno (Schaffrath et al., 1995). Proteínas de baixo peso molecular denominadas elicinas, secretadas por *Phytophthora* spp. são translocadas no vegetal, estimulando necrose sistêmica e induzindo resistência (Kamoun et al., 1993; Keller et al., 1996; Ricci et al., 1989).

2.2.2 Supressores

O termo supressor é definido como determinante para patogenicidade (especificidade) sem efeitos fitotóxicos aparentes. Uma abordagem mais detalhada dessas moléculas mostra as seguintes características: são produzidas pelos patógenos no sítio de infecção; participam na supressão da resistência e na indução de suscetibilidade local (acessibilidade) na planta hospedeira; são específicas ao hospedeiro e não tóxicas às plantas (Shiraishi et al., 1997).

Segundo Dixon & Lamb (1990), diversas moléculas com atividade supressora da resposta de defesa em plantas foram isoladas de fontes microbianas. Estas moléculas incluem glicanas, fosfoglicanas, glicopeptídeos, glicoproteínas, peptídeos, bem como um oligossacarídeo derivado de uma glicoproteína elicitora (Basse & Boller, 1992; Shiraishi et al., 1997).

A supressão é observada também em interações com patógenos biotróficos. A deposição sucessiva de conídios de *Erysiphe graminis* sobre folhas de cevada num intervalo maior que 2 horas, não permite a penetração da célula hospedeira pelo segundo conídio, pela liberação de elicitor(es) pelo primeiro conídio e conseqüente indução de inacessibilidade. Caso um conídio seja depositado na mesma célula onde outro conídio tenha sido depositado previamente, em período menor que 2 horas, ocorre suscetibilidade da célula à penetração pelo outro conídio, pela liberação de supressor(es) e supressão de inacessibilidade. Embora estes autores tenham utilizado os termos supressor(es) e elicitor(es), não foi efetuada a purificação ou caracterização de tais moléculas (Kobayashi et al., 1995).

2.2.3 Receptores e Transdução de Sinais

O reconhecimento de moléculas de origem biológica, que desencadeiam respostas de defesa na planta, é possivelmente efetuado por receptores localizados na membrana plasmática das células vegetais, que podem discriminar entre moléculas ativas e inativas (Nürnberg et al., 1994; Smith, 1996). O modelo mais aceito é o de ligação do elicitor a uma proteína ligadora específica (“binding-protein”, o possível receptor), resultando na transdução de sinais, os quais desencadeiam direta ou indiretamente a resposta de defesa (Boller, 1995; Dixon et al., 1994; Hahn, 1996). No modelo fisiológico para a teoria gene-a-gene, os elicitores são codificados por genes de avirulência (*Avr*), sendo reconhecidos por receptores codificados por genes de resistência (*R*) (Gabriel & Rolfe, 1990; Keen, 1990). Uma característica marcante deste modelo é que genes *R* de diversos vegetais, com especificidade para uma ampla gama de patógenos virais, bacterianos e fúngicos, codificam proteínas estruturais similares (Bent, 1996).

Possíveis receptores celulares para as moléculas elicitoras devem apresentar características tais como ligação específica, reversibilidade da ligação, saturação e alta afinidade pelo ligante (ou elicitor) (Côté et al., 1995). Entre os possíveis receptores estudados, incluem-se as proteínas ligadoras do elicitor hepta- β -glicosídeo em soja, as proteínas ligadoras de elicitores oligo-quitínicos em tomate e arroz, as proteínas ligadoras de glicoproteína em trigo e em tomate, as proteínas ligadoras de peptídeos, polipeptídeos, elicitinas e elicitores codificados por genes de avirulência (Hahn, 1996).

Os sinais envolvidos na ativação de respostas de defesas pelos elicitores não estão completamente esclarecidos, entretanto, existem candidatos que podem funcionar como sinalizadores intra- e intercelulares. Os eventos que podem ocorrer após o reconhecimento de elicitores são: alteração no fluxo de íons, como Ca^{2+} ; explosão oxidativa, produção de intermediários reativos de oxigênio e peroxidação de lipídeos; fosforilação/desfosforilação de proteínas; produção de ácido jasmônico e metil jasmonato; reações envolvendo AMP cíclico e proteínas G (não em sequência) (Dixon et al., 1994; Smith, 1996). A produção destes mensageiros celulares, ocasiona a transcrição

dos genes de defesa e a resposta de defesa é estabelecida (Dixon & Lamb, 1990; Dixon et al., 1994; Leite et al., 1997).

Desta forma, a elucidação dos eventos intracelulares desencadeados pelos elicitores, bem como o papel de receptores na célula vegetal, requer a disponibilidade de elicitores purificados e caracterizados quanto à sua estrutura (Smith, 1996), de modo a estabelecer modelos de interação elicitor-receptor e permitir o entendimento dos processos bioquímicos envolvidos.

2.3 Indução de Resistência

Após a demonstração de que infecções causadas por TMV restringiam infecções subsequentes (Ross, 1961), muitas pesquisas foram conduzidas com o intuito de se entender os mecanismos envolvidos na resistência, bem como na tentativa de, através da indução de resistência, evitar ou diminuir a ocorrência de doenças (Pascholati & Leite, 1995; Ryals et al., 1994).

A indução de resistência pode ser diferenciada da resistência raça-específica no sentido de que a primeira permite proteção quantitativa contra um amplo espectro de microrganismos, enquanto na última, a proteção é conferida contra uma determinada raça do patógeno (Schneider et al., 1996).

A resistência induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento provocador ou desafiador). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e ou acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida (Pascholati & Leite, 1995). Um aspecto que deve ser distinguido na indução de resistência é que pode ocorrer a indução de resistência local, restrito ao sítio de aplicação do tratamento indutor. Enquanto que a outra forma, denominada sistêmica, é observada também em partes que não aquelas que receberam o tratamento indutor e do ponto de vista prático, é a mais desejável.

Embora o nível de proteção possa variar, a duração da resistência usualmente estende-se por longos períodos, podendo ser detectada em poucas horas a

partir da primeira inoculação ou necessitando de semanas para se tornar efetiva (Schneider et al., 1996). A resistência sistêmica adquirida (RSA) tem sido observada em diversas plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas (Schneider et al., 1996), podendo ser obtida através do tratamento com agentes bióticos ou abióticos (Kessmann et al., 1984a; Kessmann et al., 1984b). Por exemplo, plantas de café exibem indução de resistência ao patógeno *Hemileia vastatrix* pelo tratamento prévio com uredíniosporos autoclavados (Moraes et al., 1976), com o filtrado da suspensão de uredíniosporos autoclavados (Beretta et al., 1977) ou mediante tratamento com alguns fungos e bactérias não patogênicos ao cafeeiro (Martins et al., 1985).

A RSA implica na produção de um sinal sistêmico no sítio de infecção, o qual é translocado para outras partes da planta, onde ocorre indução dos mecanismos de defesa. Dentre os propostos sinais envolvidos nesta forma de resistência encontram-se o ácido salicílico, um polipeptídeo denominado sistemina, o etileno, o ácido jasmônico e metil jasmonato, além de possíveis sinais elétricos (Schneider et al., 1996). Segundo Kunkel (1996), a existência de estruturas e características organizacionais similares em diversos genes governando resistência para diversos patógenos, sugere que a resistência de plantas as doenças possa ser mediada através de um mecanismo molecular comum. Entre os vegetais existem milhares de genes *R* com especificidade a patógenos virais, bacterianos, fúngicos e nematóides e a similaridade entre os produtos dos genes *R*, sugere um alto grau de conservação mecanística entre os caminhos que as plantas utilizam para disparar as respostas de defesa (Bent, 1996).

Fenômenos de proteção tem sido observados mediante o emprego da levedura *S. cerevisiae* em plantas de milho, sorgo, café, eucalipto e maracujá (Piccinin 1995; Roveratti, 1989; Silva & Pascholati, 1992; Stangarlin & Pascholati, 1994), embora a indução de resistência não tenha sido detalhadamente estudada, pois houve um maior esclarecimento sobre o modo de ação da levedura sobre os patógenos.

2.4 Controle Biológico

Segundo Cook & Baker (1983), o controle biológico poder ser definido como a redução da quantidade de inóculo ou atividade produtora de doença do patógeno, feito por ou através de um ou mais organismos que não o homem. Usualmente é descrito na forma de antibiose, competição ou hiperparasitismo.

Dentre os microrganismos encontrados no filoplano, incluem-se bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos, sendo que a população dominante varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do vegetal e com as condições climáticas (Bettiol, 1997). As leveduras, como componentes do filoplano (Phaff & Starmer, 1987), podem ser utilizadas no controle de doenças como medida alternativa (Filonow et al., 1996; Fokkema et al., 1979; Urquhart et al., 1994; Williamson et al., 1985; Wisniewski et al., 1991). A levedura *S. cerevisiae* tem sido utilizada como agente controlador de doenças em sorgo (Lopez, 1991; Piccinin, 1995), milho (Stangarlin & Pascholati, 1984; Silva & Pascholati, 1992;) e café (Roveratti, 1989). Nestas plantas, a levedura reduziu a germinação e a formação de apressórios (Silva & Pascholati, 1992), bem como reduziu o número de esporos dos patógenos que aderiram às folhas (Roveratti, 1989). Preparações de extrato de levedura conferem proteção em cevada, com aumentos na atividade da enzima FAL e deposição de calose (Lyon et al., 1995).

Observa-se desta maneira, que a relação estabelecida entre patógeno e hospedeiro é muito dinâmica e o fenótipo resistência ou suscetibilidade resulta da ação de variados mecanismos de ambas as partes.

2.5 Componentes Estruturais de *Saccharomyces cerevisiae*

A parede celular das leveduras tem composição química relativamente simples, consistindo quase que inteiramente de homopolissacarídeos de glicose, manose e *N*-acetilglicosamina. β -glicana representa o componente estrutural principal, contendo ligações 1,3 e 1,6. Manana está presente na forma de um polissacarídeo ligado a proteína e representa o único componente da parede celular de leveduras a apresentar natureza glicoproteica. Algumas manoproteínas também apresentam cadeias compostas de glicose

em ligação $\beta(1,6)$. As glicanas e as manoproteínas ocorrem em quantidades aparentemente iguais na parede (Cabib et al., 1982; Klis, 1994).

Manoproteínas (polímeros de manose ligados a proteínas) são facilmente extraíveis de células intactas por autoclavagem em condições alcalinas ou neutras. As manoproteínas solúveis em água obtidas por estes procedimentos, formam um grupo heterogêneo, exibindo variadas massas moleculares, conteúdo de açúcares e cargas moleculares, incluindo enzimas como invertase e fosfatase ácida (Cabib et al., 1982). Shibata et al. (1983) citam que as manoproteínas estão complexadas com fósforo, formando um complexo fosfomanoproteína. Estes polímeros apresentam dois componentes: um neutro, contendo pouco ou nenhum fosfato e outro ácido, contendo pequenas quantidades de fosfato e nitrogênio peptídico (Okubo et al., 1978). Em contraste à detalhada informação que existe a respeito da porção carboidrato das manoproteínas, a porção proteica tem recebido pouca ou nenhuma atenção (Cabib et al., 1982).

As diferentes classes de glicanas, podem ser distinguidas por suas características de solubilidade. Tratamento alcalino em células intactas solubiliza muita pouca glicana e subsequente aquecimento com ácido acético solubiliza glicana com predomínio de ligações $\beta(1,6)$. Quitina, um polímero de *N*-acetilglucosamina $\beta(1,4)$, existe nas formas cristalinas designadas de α , β , γ . Nas paredes de levedura encontra-se quitina α , a qual devido a orientação antiparalela de suas cadeias e formação de pontes de hidrogênio é altamente resistente à extração química (Cabib et al., 1982).

A orientação estrutural destes componentes é de tal maneira que a manana localiza-se na parte externa da parede, entremeando-se com glicana, as quais podem estar covalentemente ligadas (Zlotnik et al., 1984). Na parte mais interna da parede, a glicana forma um material fibrilar, o qual confere rigidez à célula. A maior parte da quitina restringe-se às regiões de formação das gêmulas, sendo sintetizada no primórdio do septo que irá formar a gêmula (Cabib et al., 1982). Uma pequena porcentagem da quitina está ligada a glicana $\beta(1,3)/(1,6)$, formando um complexo insolúvel mesmo após extração com álcali à quente (Klis, 1994). A localização das manoproteínas na superfície, bem como

nas camadas internas da parede celular de *S. cerevisiae*, foi detalhadamente estudada com aglutinação de células por anticorpos contra mananas e ligação de concanavalina A à superfície celular (Cabib et al., 1982).

O modo de extração das manoproteínas, envolve na maioria dos casos extração à quente e posterior precipitação com metanol ou etanol (Cifonelli & Smith, 1955; Frevert & Ballou, 1985; Peat et al., 1961). Vallentin et al. (1984) empregaram diversos modos de solubilização no estudo de manoproteínas e dentre as técnicas empregadas, a fervura com SDS 2 % conferiu a melhor forma de solubilização (em termos quantitativos). Estes autores destacam também que manoproteínas solubilizadas mediante autoclavagem, apresentaram baixa precipitabilidade em etanol 75 % (v/v).

3 METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cv. Brandes foram desinfetadas superficialmente com etanol 50 % (2 min), hipoclororito de sódio 1% (15 min), lavadas em água destilada e embebidas em água por um período de 6 h, a temperatura ambiente. Posteriormente foram enroladas entre folhas de papel de germinação umedecidas com água e incubadas no escuro por um período de 72-90 h (28-30 °C). Após este período no escuro, as plântulas foram mantidas por 4 h na luz, visando parar o estiolamento. Obtiveram-se desta maneira, plântulas com mesocótilos uniformemente alongados e adequados para o ensaio de produção de fitoalexinas (Heim et al., 1983; Nicholson et al., 1988; Yamaoka et al., 1990).

3.2 Bioensaio para Produção de Fitoalexinas em Mesocótilos de Sorgo

A atividade elicitora do acúmulo de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas em sorgo, pelas preparações obtidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen), foi feita com base na determinação espectrofotométrica do acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos estiolados (Lopez & Pascholati, 1992; Nicholson et al., 1987; Roncatto & Pascholati, 1993; Yamaoka et al., 1990). Cinco mesocótilos (4-5 cm) foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubo de ensaio (1,2 x 10,0 cm) contendo 3 mL das preparações elicitoras. Estes tubos foram mantidos em câmara úmida, a 25 °C sob luz fluorescente por um período de 60 h. Mesocótilos controle foram incubados em água destilada esterilizada.

Para a avaliação do acúmulo de fitoalexinas, os mesocótilos foram retirados dos tubos de ensaio e secos, sendo os 5 mm basais de cada mesocótilo excisados e descartados. A porção acima (2,0 cm) destes 5 mm basais foi excisada, pesada e colocada em metanol 80 % acidificado com HCl a 0,1 % (v/v) (Nicholson et al., 1987). Tratamentos nos quais o tecido acima da superfície da amostra elicitora (acima de 2,5 cm da base do mesocótilo) estivesse pigmentado, foi coletado todo este tecido pigmentado, ou seja, mais que os 2,0 cm utilizados nos demais tratamentos. Para a extração dos pigmentos foi mantida a proporção 1:50, entre massa de tecido vegetal fresco (g) e volume de metanol acidificado (mL). Desta forma foi permitida a comparação direta entre os tratamentos. Os mesocótilos cortados foram mantidos a 4 °C em metanol acidificado por um período de 96 h, para permitir a completa extração dos pigmentos. A absorbância do solvente foi avaliada a 480 nm (Nicholson et al., 1987; Nicholson et al., 1988), sendo os dados expressos em A_{480} por grama de tecido fresco ($A_{480} \text{ gtf}^{-1}$).

3.3 Determinação da Concentração de Proteínas e Carboidratos

Para a quantificação dos teores de proteína das preparações, foi utilizado o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão (**Apêndice 1**), ou determinação espectrofotométrica a 280 nm. Os carboidratos foram quantificados pelo método de Lever (1972), usando glicose como padrão (**Apêndice 2**).

3.4 Preparações Elicitoras

Levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), produto comercial Fermento Biológico Fresco Fleischmann[®], foi utilizado como fonte de células. Inicialmente foi utilizado o procedimento descrito em Roveratti (1989), no qual partindo de uma suspensão de células de levedura (20 mg mL⁻¹) foram preparadas soluções e filtrados (0,45 µm e 0,2 µm) das suspensões de células, autoclavadas ou não (**Figura 1**).

Também foram efetuados ensaios partindo de amostras na concentração de 200 mg mL⁻¹, com diluições variando a concentração final de proteínas e carboidratos

na amostra entre 0 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções (filtrado de suspensão de células; filtrado da suspensão de células autoclavadas) foram preparadas da mesma forma como ilustrado na **Figura 1** e utilizadas após as diluições apropriadas. A obtenção da preparação elicitora bruta é descrita no item seguinte (3.5 Precipitação Etanólica).

Figura 1. Esquema do procedimento para a obtenção de amostras de células autoclavadas ou não, a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e seus filtrados (Roveratti, 1989).

3.5 Precipitação Etanólica

Em 1 litro de água destilada esterilizada foram dissolvidas 200 g de células (levedura de panificação), as quais foram submetidas a autoclavagem (30 min, 121 °C) para solubilização das moléculas elicitoras. A suspensão resultante foi mantida em agitação por 1 h (agitador magnético), sendo posteriormente centrifugada a 15 000 g, por 10 min a 4 °C. Ao sobrenadante em agitação (1 litro, pH 5,7 a 4 °C), foi adicionado volume idêntico de etanol absoluto gelado (1 litro) e mantido a 4 °C durante 96 h. Esta solução [etanol 50 % (v/v)] foi então centrifugada (20 000 g, 20 min a 4 °C) e o sobrenadante concentrado em evaporador rotativo, a 40 °C sob pressão reduzida, para um volume final de 946 mL. Esta preparação, considerada como preparação elicitora bruta, foi congelada (- 20 °C) e utilizada nos experimentos subsequentes. Os precipitados foram descartados.

3.6 Separação das Frações Ativas por Cromatografia de Coluna

Uma alíquota de 120 mL da preparação elicitora bruta (27 mg carboidrato e 72 mg proteína) foi concentrada em saco de diálise (exclusão de moléculas com massa de 12 a 16 kDa) contra polietilenoglicol (PEG) 20 000, a 4 °C, para um volume de 65 mL. O pH original da solução (pH 5,3) foi ajustado para 8,0 adicionando-se 7 mL de Tris (Tris[hidroximetil]aminometano) 100 mM. A seguir, esta preparação (72 mL) foi filtrada em membrana de 0,22 µm e submetida a cromatografia de troca iônica.

3.6.1 Cromatografia de Troca Iônica (CTI)

Para a realização da cromatografia de troca iônica, uma coluna de vidro (5 x 25 cm) foi preenchida com Dietilaminoetil Celulose (DEAE Celulose-Sigma), formando um gel com volume de 117 cm³, equilibrado com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Uma amostra da preparação elicitora bruta dialisada (70 mL contendo 57 mg de proteína e 18,5 mg carboidrato) foi aplicada ao leito da coluna de DEAE-Celulose e eluída com o mesmo tampão de equilíbrio (Tris-HCl, 10 mM, pH 8) a fluxo de 10 mL min⁻¹, mantido com bomba peristáltica. Após a eluição de 600 mL do tampão, o material adsorvido ao

gel, foi deslocado com gradiente linear de NaCl (0 a 500 mM) no mesmo tampão, estabelecido com auxílio de um formador de gradiente. As frações coletadas foram de 5 mL, sendo as concentrações de NaCl determinadas indiretamente pela medida de condutividade das frações eluídas em gradiente salino (**Apêndice 3**), com auxílio de um condutivímetro (Hanna Instruments).

Nas frações coletadas foram dosados carboidratos (Lever, 1972) e a presença de proteínas foi detectada espectrofotometricamente a 280 nm, mediante diluições apropriadas. Estas frações (210 no total = 1050 mL), foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e carboidratos. As frações reunidas foram dialisadas contra água destilada (12 litros) a 4° C, com 8 horas de intervalo entre as trocas de água (3 repetições). Aliquotas de 0,5 e 1,5 mL foram avaliadas quanto a capacidade elicitora de fitoalexinas em sorgo, como descrito acima.

3.6.2 Cromatografia de Filtração em Gel (CFG)

Para a execução da cromatografia de filtração em gel, uma coluna de vidro (1 x 60 cm) foi preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma), formando um gel sedimentado de 45,6 cm³. Amostras provenientes da cromatografia de troca aniônica, foram concentradas em membrana de diálise contra PEG 20.000 e concentradas novamente em evaporador a vácuo (Integrated SpeedVac System ISS100 - Savant) a 43° C, para um volume final de 1 mL. Estas amostras foram centrifugadas (5 min, 10 000 g), aplicadas sobre o leito da coluna e eluídas.

O fluxo da coluna foi ajustado para 0,5 mL min⁻¹ com o auxílio de bomba peristáltica. As amostras foram eluídas com água destilada, sendo coletadas frações de 1 mL. O monitoramento das frações foi efetuado espectrofotometricamente a 280 nm. As frações que apresentavam proteínas foram reunidas de acordo com o perfil de eluição e o conteúdo de proteínas e carboidratos foi mensurado como descrito no item 3.3. As frações reunidas foram testadas quanto a atividade elicitora, como descrito anteriormente (item 3.2)

Para a coluna preenchida com Sephacryl S-100-HR foi feita uma curva de calibração com 3 padrões de massas moleculares do “Kit” MW-GF-70 (Sigma). Os padrões foram os seguintes: albumina de soro bovino (66 kDa) - 4 mg mL⁻¹, anidrase carbônica (29 kDa) - 2 mg mL⁻¹ e citocromo *c* (12,4 kDa) - 1,6 mg mL⁻¹. O volume vazio (Vo) da coluna foi determinada com azul de dextrana, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Os padrões foram eluídos da mesma forma como as amostras, exceto que a eluição foi efetuada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 (**Apêndice 4**).

3.7 Ensaio com Amostras sem Atividade Elicitora

Visando caracterizar o possível fracionamento de supressores ou inibidores da síntese de fitoalexinas, foram incubadas amostras que não causaram acúmulo de fitoalexinas em sorgo, provenientes da cromatografia de troca iônica. Das frações 18 a 28 foi utilizada uma alíquota de 1,8 mL, juntamente com 200 µL da preparação elicitora bruta (item 3.5). Estas amostras foram reunidas, o volume final da amostra foi completado para 3 mL com água destilada esterilizada e o ensaio foi realizado como descrito no item 3.2.

3.8 Tratamento das Amostras com Proteinase K

As frações mais ativas proveniente da cromatografia de filtração em gel, foram tratadas com proteinase (Proteinase K [Sigma], estoque 5 µg µL⁻¹). Cinco mL da preparação foram incubados (38 °C), na presença de 50 µL da solução de proteinase por 13 h, seguido de nova adição de enzima (50 µL da solução de proteinase) e incubação adicional por mais 10 h, sendo posteriormente aquecidos a 100 °C por 10 min. Foram adicionados 200 µL de tolueno por amostra para evitar a contaminação por microrganismos. Após fervura, as amostras foram submetidas a evaporação (43 °C) a vácuo por 1 h e então diluídas para um volume final de 10 mL para avaliação da atividade elicitora em mesocótilos de sorgo. Controles consistindo da preparação elicitora sem proteinase e água destilada mais proteinase foram efetuados, seguindo o mesmo procedimento da amostra.

4 RESULTADOS

4.1 Acúmulo de Fitoalexinas

Mesocótilos tratados com as preparações elicitoras obtidas a partir de *S. cerevisiae*, apresentaram pigmentação característica das fitoalexinas de sorgo, com os tecidos variando a coloração em intensidade, do laranja-escuro a vermelho (**Figura 2**). O tempo de coleta dos mesocótilos foi estabelecido em 60 h, período no qual as fitoalexinas já foram sintetizadas e são extraídas pelo solvente. Estas fitoalexinas apresentam um pico de absorbância na região de 480 nm (**Figura 3**) (Lo et al., 1996; Nicholson et al., 1987; Nicholson et al., 1988).

4.2 Fracionamento dos Componentes Elicitores-Ativos a Partir de *S. cerevisiae*

A aplicação de células de levedura (preparação nº 1) em mesocótilos de sorgo causa a produção de fitoalexinas e seu filtrado (preparação nº 6) exibe baixa atividade elicitora quando comparado ao tratamento com água (**Tabela 1**). As células retidas no filtro e ressuspensas em água, retém atividade elicitora considerável (preparação nº 5). Quando as células de levedura são autoclavadas e seu filtrado (0,22 µm) é utilizado (preparação nº 3), observa-se atividade elicitora significativa.

Figura 2. Mesocótilos de sorgo incubados em água (a), com a preparação elicitora bruta obtida de *S. cerevisiae* (b) ou com a fração 'supressora' (c). Fotografia obtida 60 h após tratamento. Barra corresponde a 1 cm.

Figura 3. Espectro de absorvância do extrato metanólico obtido de mesocótilos de sorgo tratados com a preparação elicitora de *S. cerevisiae* (a) ou com água (b). Extrato metanólico obtido de mesocótilos, 60 h após o tratamento elicitor.

Como ilustrado na **Figura 4**, houve solubilização de proteínas mediante autoclavagem, embora o conteúdo de carboidratos tenha diminuído. Nestas moléculas solubilizadas, devem estar as moléculas com atividade elicitora, pois as células autoclavadas e ressuspensas em água (preparação nº4), não diferem em relação ao controle, quanto à produção de fitoalexinas (**Tabela 1**).

Tabela 1. Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo mediante tratamento com preparações de *S. cerevisiae* e seus filtrados, autoclavados ou não.

Preparação [†]	A ₄₈₀ gtf ⁻¹ ‡
1 Suspensão de células (20 mg mL ⁻¹)	3,39 ± 0,40 b c
2 Suspensão de células (20 mg mL ⁻¹) autoclavadas	1,97 ± 0,41 a b c
3 Filtrado (0,22 µm) das células autoclavadas	3,99 ± 1,44 c
4 Células autoclavadas retidas em membrana e ressuspensas	0,38 ± 0,05 a
5 Células retidas em membrana e ressuspensas	2,46 ± 0,44 a b c
6 Filtrado (0,22 µm) das células	0,81 ± 0,18 a b
7 Filtrado (0,22 µm) de células e autoclavado	0,77 ± 0,08 a b
8 Água	0,41 ± 0,17 a

[†] Números referentes aos tratamentos constantes da **Figura 1**; [‡] Média de três repetições de um experimento representativo ± erro padrão da média; médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey P = 0,05).

Como o filtrado da suspensão de células autoclavadas (preparação nº 3) apresentou a maior atividade elicitora em sorgo (**Tabela 1**), esta preparação foi utilizada na precipitação etanólica.

Figura 4. Teores de proteínas e carboidratos das preparações filtradas obtidas de *S. cerevisiae* (20 mg mL⁻¹). Números entre parênteses referem-se às preparações da **Figura 1**.

4.3 Acúmulo de Fitoalexinas em Resposta a Concentrações Variáveis de Proteínas nas Amostras Filtradas e no Sobrenadante de Precipitação Etanólica

O acúmulo de fitoalexinas nos mesocótilos aumenta de acordo com valores crescentes de proteínas (e carboidratos) nas amostras elicitoras (**Figuras 5 e 6**). Foram utilizadas concentrações variáveis das seguintes soluções elicitoras: filtrado de suspensão de células; filtrado da suspensão de células autoclavadas (**Figura 5**) e preparação elicitora bruta (**Figura 6**).

Se a atividade elicitora específica for calculada, os valores obtidos para o filtrado de células e filtrado de células autoclavadas, são de respectivamente 299 e 214 (divide-se o valor da atividade elicitora (A_{480} gtf⁻¹) pelo conteúdo de proteínas e multiplica-se por 1000, Yamaoka et al., 1990).

Figura 5. Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo mediante tratamento com filtrado de suspensão de células (■) ou filtrado de células autoclavadas (□).

Figura 6. Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo mediante tratamento com preparação elicitora bruta (sobrenadante de precipitação etanólica) obtida de *S. cerevisiae*.

Assim, como houve solubilização das moléculas elicitoras mediante tratamento térmico, permitindo um maior rendimento para o passo seguinte de purificação, esta preparação foi utilizada para a precipitação etanólica.

A precipitação etanólica a 50 % (v/v), permitiu fracionamento inicial de carboidratos e proteínas, com 53 % das proteínas e 76 % dos carboidratos permanecendo no sobrenadante. Somente o sobrenadante apresentou atividade elicitora.

A aplicação gradual de proteínas (e carboidratos) da preparação elicitora, ocasionou acúmulo progressivo de fitoalexinas nos mesocótilos (**Figuras 5 e 6**).

4.4 Cromatografia de Coluna

Na cromatografia de troca iônica, foram adsorvidas à resina 65 % das proteínas e 6 % dos carboidratos, os quais foram eluídos em gradiente de NaCl (0 a 500 mM). Observa-se na **Figura 7** que somente as frações adsorvidas apresentaram atividade elicitora considerável.

Como as frações 18 a 28 (**Figura 7**) inibiram a produção de fitoalexinas em relação ao tratamento controle, foi feito um teste de competição com a preparação elicitora bruta, com o fim de observar supressão da atividade elicitora (**Tabela 2**). As plantas tratadas somente com a preparação elicitora produziram fitoalexinas normalmente. Porém, as incubadas com a solução supressora não acumularam fitoalexinas, mesmo na presença de elicitor.

Figura 7. Cromatografia de troca iônica da preparação elicitora bruta obtida de *S. cerevisiae*. Uma amostra de 70 mL (57 mg proteína e 18,5 mg de carboidrato) foi aplicada na resina (5 x 6 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0 e eluída. Gradiente linear de NaCl foi aplicado no mesmo tampão. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (—●—) foi determinada em 280 nm e carboidratos (—) pelo método de Lever (1972). Concentrações molares de NaCl do eluente (—○—) foram determinadas indiretamente por condutividade. Colunas representam média de 3 amostras de um experimento representativo ± erro padrão da média. Letras **a**, **b** e **c** representam frações reunidas para CFG (item 3.6.2).

Tabela 2. Competição entre frações sem atividade elicitora ('supressor') e preparação elicitora bruta obtidas de *S. cerevisiae* [†]

Preparação	A ₄₈₀ gtf ⁻¹ [‡]
Água	0,20 ± 0,09 a b
'Supressor'	0,02 ± 0,01 a
Elicitor	5,66 ± 0,26 c
Elicitor + 'supressor'	0,03 ± 0,08 a

[†] Foram utilizados 200 µl da preparação elicitora bruta e 1,8 mL das frações 18 a 28 (**Figura 7**). [‡] Média de três repetições de um experimento representativo ± erro padrão da média; médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey P = 0,05).

Amostras utilizadas na cromatografia de filtração em gel foram as seguintes: das frações 134 a 150 (**Figura 7**), foi aplicada uma alíquota de 1 mL contendo 2,5 mg de proteínas e 0,35 mg de carboidratos. Das frações 151 a 167, foi utilizada uma alíquota de 1 mL contendo 1,2 mg de proteínas e 0,1 mg de carboidratos. Das frações 168 a 184, foi utilizada uma alíquota de 1 mL contendo 176 µg de proteínas e 65 µg de carboidratos.

As frações adsorvidas na troca iônica e apresentando atividade elicitora, foram eluídas de forma diferenciada na cromatografia de filtração em gel. Houve porém, frações com perfil cromatográfico similar, indicando haver ao menos um grupo de moléculas com massa molecular semelhante nas frações adsorvidas à resina aniônica (**Figura 8**). Somente as frações dos picos 2 e 3 (**Figura 8 b e c**) apresentaram atividade elicitora expressiva, embora as frações do pico 2 e 3 (**Figura 8 a**), também tenham diferido significativamente do controle quanto à produção de fitoalexinas. A massa molecular das frações ativas, relativas aos picos 2 e 3 da **Figura 8 c** é de aproximadamente de 18,4 - 22,4 kDa. Enquanto as frações ativas relativas aos picos 2 e 3 da **Figura 8 b e a** possuem massa molecular de aproximadamente 18,4 - 25 kDa.

Figura 8. Cromatografia de filtração em gel das frações adsorvidas em DEAE-Celulose. (a) Amostra de 1 mL das frações 134 a 150 (**Figura 7**); (b) Amostra de 1 mL das frações 151 a 167; (c) Amostra de 1 mL das frações 168 a 184. Amostras preparadas como descrito em 3.6.2 e aplicadas em Sephacryl (Sigma) S-100-HR (1 x 58 cm) e eluídas com água destilada. Fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Frações coletadas de 1 mL. Conteúdo de proteínas (—) monitorado em 280 nm. Colunas representam média de 3 amostras de um experimento representativo $\pm$ erro padrão da média.

4.5 Tratamento Enzimático

O tratamento da amostra mais ativa, proveniente da filtração em gel (frações dos picos 2 e 3, **Figura 8 c**), com proteinase K reduziu sua atividade elicitora (**Tabela 3**). A solução de proteinase desnaturada, sozinha ou na presença da preparação elicitora bruta, não influenciou no acúmulo de fitoalexinas, da mesma forma que a incubação a 38 °C não alterou a atividade do elicitor (dados não mostrados).

Tabela 3. Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo após tratamento enzimático com proteinase das frações elicitoras mais ativas (elicitor) provenientes da cromatografia de filtração em gel, obtidas de *S. cerevisiae*[†]

Tratamento	A ₄₈₀ gtf ^{1 ‡}	
Água	0,20 ± 0,09	a
Elicitor + proteinase	3,26 ± 0,80	a b
Elicitor	6,70 ± 1,49	b

[†] Picos 2 e 3 (frações 34 a 49), provenientes da cromatografia de filtração em gel (**Figura 8 c**); [‡] Média de três repetições de um experimento representativo ± erro padrão da média; médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey P = 0,05).

Observa-se na **Tabela 4** que as frações que contém os picos 2 e 3 de eluição das proteínas apresentam também carboidratos. Estas frações são as mais ativas como elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (**Figura 8**). Na **Tabela 5** estão ilustrados os valores referentes à atividade elicitora específica (AEE). Nos passos utilizados para o fracionamento das moléculas elicitoras, observa-se que a AEE para proteínas (AEE/p) é maior no último passo do fracionamento, o que não ocorre no caso da AEE para carboidratos (AEE/c).

Tabela 4. Teores de proteínas e carboidratos das frações reunidas, provenientes da cromatografia de filtração em gel [†] (**Figura 8**)

Amostra	Frações No.	Pico No.	µg proteína mL ⁻¹	µg carboidrato mL ⁻¹
a	8 a 14	-	1,5	-
	15 a 23	Vo [‡]	9,3	12,7
	24 a 32	1	16,8	2,37
	33 a 42	2 e 3	39,3	27,2
	43 a 50	4 e 5	2,7	0,52
	51 a 66	6	0,9	-
	67 a 78	-	0,8	-
	79 a 92	-	0,6	-
b	14 a 19	Vo	9,8	-
	20 a 31	-	2,45	-
	32 a 40	1	28,6	16,5
	41 a 49	2 e 3	21,8	12,7
	50 a 55	4	0,64	-
	56 a 67	-	0,48	-
	68 a 78	-	0,74	-
	79 a 95	-	0,69	-
c	15 a 20	Vo	3,9	-
	21 a 33	1	3,9	-
	34 a 49	2 e 3	1,54	4,23
	50 a 55	4	1,44	-
	56 a 68	-	1,0	-
	69 a 95	-	0,85	-

[†] massa de proteína e carboidrato na amostra utilizado no ensaio referente a **Figura 8**;

[‡] fração No. 18.

Tabela 5. Atividade elicitora específica (AEE) das preparações elicitoras obtidas a partir de *S. cerevisiae*

Tratamento	A ₄₈₀ gtf ¹	µg proteína mL ⁻¹	AEE/p ^a	µg carboidrato mL ⁻¹	AEE/c ^b
Filtrado de células autoclavadas ^c	1,78 ± 0,22	18,62	96	40,1	42
Preparação elicitora bruta ^d	5,89 ± 0,96	58,74	100	41	137
Frações No. 168-174 (CTI) ^e	13,36 ± 2,55	6,4	2088	1,3	9462
Frações No. 175-184 (CTI) ^e	8,87 ± 1,22	3,5	2534	0,8	10163
Picos 2 e 3 (Figura 8 c - CFG) ^f	11,07 ± 1,46	1,54	7188	4,23	2411

^a Atividade Elicitora Específica: A₄₈₀ gtf¹ dividido pelo conteúdo de proteína da amostra multiplicado por 1000 (Yamaoka et al., 1990); ^b como descrito em ^a, porém com o conteúdo de carboidrato da amostra; ^c suspensão de células (20 mg mL⁻¹); ^d diluído para uma concentração equivalente a 40 mg células de levedura mL⁻¹; ^e 1,5 mL das frações reunidas (**Figura 7**); ^f frações 34 a 49 da cromatografia de filtração em gel.

5 DISCUSSÃO

Mesocótilos de sorgo tratados com soluções obtidas de *S. cerevisiae* acumulam fitoalexinas laranja-avermelhadas (**Figura 2**) que apresentam absorbância máxima entre 480 e 490 nm em solução metanólica (Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1996; Lopes & Pascholati, 1992; Nicholson et al., 1987; Nicholson et al., 1988) (**Figura 3**). De acordo com Nicholson et al. (1987), o sorgo acumula estes pigmentos fenólicos, como uma resposta à tentativa de penetração por fungos patogênicos e não patogênicos, sendo que quatro destes compostos foram identificados como fitoalexinas (Nicholson et al., 1987; Hipskind et al., 1990; Lo et al., 1996). Yamaoka et al. (1990) citam que a produção de fitoalexinas aumenta linearmente em função da concentração de elicitores. Assim, assumimos que uma absorbância mais elevada em 480 nm, corresponde a uma fração com maior concentração do possível elicitor, portanto com maior atividade elicitora. Cumpre citar que, em concentrações elevadas da preparação elicitora, ocorreu o desenvolvimento de bactérias, sendo que neste caso os valores destas amostras não foram utilizados na construção dos gráficos e análise dos resultados.

A capacidade das células de *S. cerevisiae* em causar acúmulo de fitoalexinas em sorgo foi demonstrada por Freitas & Pascholati (1993) e Roncatto & Pascholati (1994), porém não foram feitos estudos quanto a natureza das moléculas elicitoras.

Estudos visando caracterizar a natureza química e a estrutura dos elicitores, requerem que quantidades apreciáveis destas moléculas estejam disponíveis em grau máximo de pureza. Entretanto, as moléculas que apresentam atividade elicitora, constituem uma pequena porção da biomassa dos microrganismos. A obtenção de moléculas de interesse requer sua extração da fonte original e esta operação emprega

muitas vezes técnicas que podem afetar a natureza ou a estrutura do produto de interesse. Técnicas como extração com ácido ou base, ruptura mecânica com emprego de detergentes e autoclavagem são meios artificiais empregados nos primeiros passos de uma purificação.

No presente trabalho, empregou-se a autoclavagem como forma a permitir a solubilização das moléculas de interesse. A eficiência da extração foi considerada boa, pois a atividade elicitora ficou restrita ao filtrado das células autoclavadas, as quais após filtração foram ressuspensas em água (preparação nº 4) e não causaram acúmulo de fitoalexinas (**Tabela 1**). Isto indica que, além das moléculas elicitoras serem resistentes ao tratamento térmico, esta é uma forma de solubilizá-las a partir das células de levedura. Portanto, o tratamento térmico não afeta a capacidade de componentes das células de levedura em estimular o acúmulo de fitoalexinas em sorgo, demonstrando a natureza termoestável das moléculas elicitoras.

Observa-se na **Figura 5** que o maior acúmulo de fitoalexinas mediante tratamento com filtrado de células autoclavadas, necessitou uma quantidade de proteínas quase 10 vezes maior do que o filtrado de células. A atividade elicitora específica do filtrado de células (299) é maior do que filtrado de células autoclavadas (214), tomando como base para cálculo o conteúdo de proteína. Este valor específico indica que o filtrado de células é uma amostra mais pura, com uma atividade específica maior em relação ao conteúdo de proteínas, porém de baixo rendimento. O menor valor para o filtrado de células autoclavadas, indica que a autoclavagem solubilizou um conteúdo elevado de moléculas (**Figura 4**), porém a quantidade de moléculas solubilizadas que contribuem para a atividade elicitora não é, proporcionalmente, tão alta quanto a do filtrado de células. Deve-se ressaltar que o valor atingido pela amostra filtrado de células autoclavadas (acúmulo de fitoalexinas = 3,99), não é um valor suficientemente alto para indicar saturação no acúmulo de fitoalexinas pelos mesocótilos de sorgo. No tempo de coleta empregado (60 h), os mesocótilos controle acumularam fitoalexinas, provavelmente como uma resposta à injúria provocada pela excisão na base do mesocótilo (Lopez & Pascholati, 1992).

Em leveduras, notadamente em *S. cerevisiae*, entre os polímeros presentes na parede celular e extraíveis mediante autoclavagem, estão as β -glicanas e as manoproteínas, sendo estes os únicos componentes da parede celular de levedura a apresentarem natureza glicoproteica (Cabib et al., 1982). As manoproteínas solúveis em água formam um grupo heterogêneo quanto a massa molecular, conteúdo de açúcares e carga elétrica. Incluem tanto componentes estruturais da parede celular como enzimas extracelulares, como invertases e fosfatase ácidas (Cabib et al., 1982).

Embora nossa preparação elicitora seja resistente à autoclavagem, alguns autores criticam este modo de obtenção de preparações elicitoras. Segundo Yoshikawa (1995), extrações por autoclavagem ou exposição a ácido ou base, não representam meios naturais pelos quais os elicitores são expostos ao reconhecimento pelas células vegetais, além de poderem alterar a conformação ou composição original dos elicitores. De fato, a própria autoclavagem representa um tratamento drástico para proteínas, causando sua desnaturação e podendo afetar os polímeros de manose (Nakajima & Ballou, 1974). Entretanto, para sabermos se tais alterações estão ocorrendo com nossas preparações, seria necessário a purificação de moléculas elicitoras a partir de células sem tratamento térmico (autoclavagem).

A precipitação com etanol é um meio empregado na obtenção dos componentes estruturais de leveduras (Cifonelli & Smith, 1955; Frevert & Ballou, 1985; Okubo et al., 1978; Peat et al., 1961) e foi empregada neste trabalho, com o objetivo de permitir o fracionamento inicial do filtrado de leveduras autoclavadas. A precipitação etanólica reduziu o conteúdo de carboidratos e proteínas no sobrenadante em quase 30 e 50 %, respectivamente, retirando da solução uma grande massa de moléculas que não apresentam atividade elicitora, pois somente o sobrenadante causou acúmulo de fitoalexinas. A precipitação dos componentes de leveduras por solventes como etanol e metanol, resulta em variabilidade quanto a porcentagem de precipitado formado (ou material mantido em solução), a qual pode ser devida aos diversos modos pelos quais a levedura é tratada antes da precipitação. Vallentin et al., (1984) testaram diversos modos de solubilização das manoproteínas em *S. cerevisiae* e concluíram que a maneira como a

solubilização é realizada, afeta a precipitabilidade das moléculas solúveis pelo etanol. Manoproteínas solubilizadas por autoclavagem apresentaram baixa taxa de precipitabilidade por etanol (Vallentin et al., 1984). Além disso, proteínas de massas moleculares menores ligados a açúcares (como as invertases) podem permanecer em solução, necessitando uma concentração elevada de etanol para sua precipitação (Ciffonelli & Smith, 1955).

Embora o acúmulo de fitoalexinas não tenha sido linear em resposta à concentrações crescentes de proteínas (**Figuras 5 e 6**), como observado por Yamaoka et al. (1990), o acúmulo de proteínas foi maior quanto maior o conteúdo de proteínas (e carboidratos) na preparação elicitora. Entretanto, mesmo utilizando-se quantidades elevadas de proteínas e carboidratos na amostra elicitora, a atividade elicitora ($A_{480} \text{ gtf}^{-1}$) não excedeu cerca de metade do valor atingido pelas amostras purificadas. Dois são os fatores que podem ter exercido influência quanto a este aspecto: as amostras utilizadas possuem além das moléculas elicitoras, moléculas supressoras da mesma atividade; o crescimento de bactérias nas amostras com altas concentrações de proteínas e carboidratos interferiu na atividade elicitora. A primeira suposição pode ser comprovada pela cromatografia de troca iônica, a qual foi eficiente não somente no sentido de fracionar moléculas com atividade elicitora, mas também no fracionamento de moléculas sem atividade elicitora (**Figura 7**). Observa-se que o acúmulo de fitoalexinas foi maior nos mesocótilos tratados com as frações eluídas após o pico de eluição dos carboidratos adsorvidos em DEAE-celulose.

O deslocamento diferencial das moléculas adsorvidas à resina, pelo cloreto de sódio em concentrações crescentes, indica que estas moléculas apresentam capacidades adsorptivas diferentes em relação à resina aniônica DEAE celulose. Okubo et al. (1978), citam que quanto mais fosfato as manoproteínas apresentam, maior é a concentração de NaCl do eluente necessária para seu desligamento. Porém, se o mesmo é verdadeiro para as frações adsorvidas em DEAE-celulose no presente trabalho não foi possível determinar. As frações 'supressoras' (frações 18 a 28 da **Figura 7**) não causaram acúmulo de fitoalexinas, mesmo quando foram testadas quanto à atividade

elicitora na presença da preparação elicitora bruta (em volume de 1,8 mL - **Tabela 2**). Este efeito supressor da síntese de fitoalexinas, exemplifica a importância de se obter uma solução elicitora o mais pura possível. Assim, moléculas que interferem na atividade elicitora não são mantidas na preparação elicitora. A separação destas moléculas sem atividade elicitora, ou até mesmo com atividade supressora, explica a alta atividade elicitora das frações adsorvidas à resina (**Figura 7**). Em um ensaio semelhante ao da **Figura 7** (item 3.6.1), porém com um volume inicial de 0.5 mL das frações 18 a 28, os mesocótilos tratados com estas frações acumularam fitoalexinas, porém não em intensidade tão alta quanto as frações mais ativas. No ensaio da **Figura 7**, as plantas que não acumularam fitoalexinas, desenvolveram-se normalmente como as demais plantas (com um volume inicial de 1,5 mL de preparação elicitora). Porém, no ensaio cujos resultados estão ilustrados na **Tabela 2**, onde foram utilizados 1,8 mL das frações ‘supressoras’ (frações 18 a 28 de **Figura 7**), estas plantas não desenvolveram os folíolos completamente, indicando a possibilidade de efeito fitotóxico, além da atividade supressora da síntese de fitoalexinas.

A ocorrência de supressores em preparações elicitoras de extrato de levedura foi descrita por Basse & Boller (1992). Estes autores isolaram um elicitor glicoproteico, a partir do qual, a porção oligossacarídica após clivagem da porção proteica, suprime a ação elicitora da molécula intacta. De acordo com Shiraishi et al. (1997), supressores são moléculas que inibem ou retardam a resposta de defesa vegetal e diferentemente das toxinas, não apresentam efeito tóxico.

As frações mais ativas como elicitoras de fitoalexinas em sorgo e adsorvidas em DEAE-celulose, foram utilizadas na cromatografia de filtração em gel, a qual permitiu o fracionamento destes em componentes ativos e não ativos (**Figura 8**). Frações com atividade elicitora significativa foram consideradas aquelas que diferiram estatisticamente do tratamento com água (frações 1 a 5 da cromatografia de filtração em gel). Desta forma, observa-se que a atividade elicitora não é propriedade de moléculas eluídas em frações correspondentes, isto é, com a mesma massa molecular. As frações ativas são as relativas aos picos 2 e 3 das **Figura 8 a, b e c**, as quais apresentam massas

moleculares diferentes, variando entre 18,4 e 25 kDa. Destaca-se que as frações dos picos 2 e 3 referentes às frações 168 e 184 da cromatografia de troca iônica eluídas na filtração em gel (**Figura 8 c**) são as mais ativas como elicitoras de fitoalexinas e apresentam massa molecular variável entre 18,4 e 22,4 kDa (**Tabela 5**). Proporcionalmente à quantidade de proteína na amostra, a atividade elicitora destas frações é maior. Observa-se também que a atividade elicitora dos picos 2 e 3, é inversamente proporcional à quantidade de carboidratos destas frações (**Tabela 4**). Em relação a massa das moléculas elicitoras, embora a diferença seja pequena, podemos inferir que ocorre influência na atividade elicitora devido a sua translocação no tecido vegetal.

Como o tratamento enzimático com endopeptidase diminuiu a atividade elicitora da preparação mais ativa (**Tabela 3**), podemos considerar que a porção proteica é necessária para a máxima expressão da atividade elicitora. Outro fator que influencia a atividade elicitora é a quantidade de carboidrato das frações provenientes da cromatografia de filtração em gel, sendo esta inversamente proporcional a sua atividade (**Tabela 4**). Quando a atividade elicitora específica é avaliada (**Tabela 5**), se calculada com base no conteúdo de proteínas, indica que houve um fracionamento progressivo de acordo com a sequência dos passos empregada. Entretanto se esta avaliação for feita com base no conteúdo de açúcares, a mesma conclusão não é verdadeira, pois as frações mais ativas provenientes da cromatografia de filtração em gel, apresentam um valor específico para carboidratos mais baixo que a etapa anterior. Um dado interessante que deve ser observado na **Tabela 4** é que a quantidade de carboidratos e de proteínas decresce da amostra a para c (picos 2 e 3), o que não acontece com a atividade elicitora (**Figura 8**).

Dessa maneira, podemos levar em consideração os seguintes fatores: as frações ativas como elicitoras apresentam proteínas e carboidratos; a necessidade da porção proteica para a atividade elicitora pode ser comprovada pela redução da atividade elicitora após tratamento com proteinase; nas frações com maior atividade (picos 2 e 3 **Figura 8**), esta é inversamente proporcional ao conteúdo de carboidratos (**Tabela 4**). Podemos assim inferir que moléculas, possivelmente de natureza glicoproteica,

apresentam atividade elicitora de fitoalexinas e que a atividade é dependente da porção proteica. Porém, não excluí-se a possibilidade da atividade elicitora estar relacionada com o componente glicosídico da fração.

Na literatura encontram-se diversos exemplos a respeito da importância da composição dos elicitores em sua atividade. Por exemplo, no elicitor glicoproteico purificado a partir de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, a porção mínima requerida para atividade elicitora, reside numa sequência de 13 aminoácidos (Nürnberger et al., 1994). Na glicoproteína purificada a partir do patógeno *Pyricularia oryzae*, a atividade elicitora requer a porção carboidrato intacta (Schaffrath et al., 1995), ao passo que o elicitor glicoproteico em tomate perde a atividade se as porções proteica e glicosídica forem separadas (Basse & Boller, 1992). A natureza proteica ou parcialmente proteica de um elicitor não implica em suscetibilidade à autoclavagem. Por exemplo, o elicitor glicoproteico purificado por Parker et al. (1991) teve sua atividade elicitora abolida pelo tratamento com proteinase, mas foi resistente à autoclavagem, indicando que a estrutura quaternária não é necessária para a manutenção da atividade elicitora.

Como a natureza das moléculas elicitórias obtidas a partir de *S. cerevisiae* não foi comprovada, não exclui-se a possibilidade de haver mais que uma forma elicitora. Isto é, pode haver elicitores suscetíveis ou não à proteinase, indicando a presença de elicitores proteicos e glicosídicos, ou duas glicoproteínas de constituição diferente com atividade elicitora. A partir do fungo não patogênico ao sorgo *Colletotrichum graminicola*, Yamaoka et al. (1990) fracionaram moléculas suscetíveis à autoclavagem e à pronase e moléculas resistentes a ambos tratamentos, sugerindo haver mais de uma forma molecular com atividade elicitora neste fungo. Davis et al. (1986) e Dixon & Lamb (1990) também citam que pode haver sinergismo entre moléculas elicitórias de natureza química diferente. A partir de extrato de levedura, Hahn & Albersheim (1978) caracterizaram carboidratos elicitores de gliceolina, os quais não apresentavam características adsorptivas, de afinidade ou tamanho em comuns. Concluíram assim que, uma porção específica, ativa como elicitora, deveria fazer parte de moléculas maiores que não apresentavam características relacionadas.

A levedura *S. cerevisiae* é indubitavelmente o microrganismo eucariótico mais estudado e pode vir a representar uma fonte de elicitores devido: a facilidade com que quantidades elevadas de levedura podem ser obtidas; existência de diversos mutantes que podem ser utilizados com o intuito de se caracterizar a importância de determinadas moléculas na atividade elicitora; por representar uma ferramenta da biologia molecular, tendo seu genoma mapeado; possibilidade na transformação de linhagens para maximização na expressão de moléculas elicitoras; os componentes estruturais podem ser marcados radioativamente, podendo ser obtidos diretamente da célula, elicitores marcados para estudos da ligação com receptores.

Convém ressaltar que da mesma forma que poucas fitoalexinas são estudadas em monocotiledôneas, os elicitores de *S. cerevisiae* parcialmente purificados, fazem parte dos poucos elicitores estudados nestas plantas, contribuindo para o entendimento das relações planta-patógeno em sorgo, uma planta da família Poaceae.

6 CONCLUSÕES

1. *Saccharomyces cerevisiae* possui moléculas elicitoras, as quais apresentam capacidade de causar o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo;
2. As frações ativas como elicitoras, termoestáveis e solúveis em etanol a 50 %, exibem variação de massa molecular entre 18,4 e 25 kDa, apresentando proteínas e carboidratos;
3. O tratamento com proteinase K reduz a atividade elicitora das frações mais ativas em aproximadamente 50 %;
4. Além de elicitores de fitoalexinas, foram fracionadas a partir de *S. cerevisiae* frações que possuem a capacidade de suprimir esta atividade, podendo ser consideradas como supressores, as quais contém proteínas e carboidratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- ALGHISI, P.; FAVARON, F. Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.365- 375, 1995.
- AYERS, A.R.; EBEL, J.; VALENT, B.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions
X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology**, v.57, p.760-765, 1976.
- BAILEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. **Phytoalexins**. Glasgow: Blackie, 1982. 334p.
- ✱ BASSE, C.W.; BOLLER, T. Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells. *N*-Linked glycans are essential for activity but act as supressors of the same activity when released from the glycopeptides. **Plant Physiology**, v.98, n.4, p.1239-1247, Apr. 1992.
- BENT, A.F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **The Plant Cell**, v.8, n.10, p.1757-1771, Oct. 1996.
- BERETTA, M.J.; MARTINS, E.M.F.; WALKYRIA, B.C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of the inducing action in coffee plants. **Summa Phytopathologica**, v.3, n. 1, p.66-70, jan./mar. 1977.

- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p. 59-97, 1997.
- BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.189-214, 1995.
- BOSTOCK, R.M.; KUC, J.A.; LAINE, R.A. Eicosapentanoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. **Science**, v.212, p.67-69, Apr. 1981.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CABIB, E.; ROBERTS, S.; BOWERS, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.51, p.763-793, 1982.
- CIFONELLI, J.A.; SMITH, F. The polysaccharide associated with yeast invertase. **Journal of The American Chemical Society**, v.77, p.5682-5684, 1955.
- COLLMER, A.; KEEN, N.T.; The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.383-409, 1986.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul: APS Press, 1983. 539p.
- CÔTÉ, F.; CHEONG, J-J.; ALBA, R.; HAHN, M.G. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexin synthesis in soybean. **Physiologia Plantarum**, v.93, n.2, p.401-410, 1995.

- DAVIS, K.R.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XXXI. Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the induction of phytoalexin accumulation in soybean. **Plant Molecular Biology**, v.6, p.23-32, 1986.
- DAVIS, K.R.; LYON, G.D.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host pathogen interaction. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by relasing plant cell wall fragments. **Plant Physiology**, v.74, p.52-60, 1984.
- DE WIT, P.J.G.M.; ROSEBOOM, P.H.M. Isolation, partial characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates, mycelium and cell walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). **Physiological Plant Pathology**, v.16, p.391-408, 1980.
- DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.479-501, 1994.
- DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.339-367, 1990.
- DOWNUM, K.R. Light-activated plant defense. **The New Phytologist**, v.122, n.3, p.401-420, Nov. 1992.
- EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytophatology**, v.24, p.235-264, 1986.
- ELLISTON, J.; KUC, J.; WILLIAMNS, E.B.; RAHE, J.E. Relationship of phytoalexin accumulation to local and systemic protection of bean against anthracnose. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.88, n.2, p.114-130, Feb. 1977.

- FARMER, E.E.; HELGESON, J.P. An extracellular protein from *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* is associated with stress metabolite accumulation in tobacco callus. **Plant Physiology**, v.85, n.3, p.733-740, Nov. 1987.
- FERREIRA, A.S.; WARREN, H.L. Resistance of sorghum to *Colletotrichum graminicola*. **Plant Disease**, v.66, n.9, p.773-775, Sept. 1982.
- FILONOW, A.B.; VISHNIAC, H.S.; ANDERSON, J.A.; JANISIEWICZ, W.J. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. **Biological Control**, v.7, n.2, p.212-220, Oct. 1996.
- FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. **Phytopathology**, v.45, p.680-685, Dec. 1955.
- FOKKEMA, N.J.; DEN HOUTER, J.G.; KOSTERMAN, Y.J.C.; NELIS, AL. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. **Transactions of British Mycological Society**, v.72, n.1, p.19-29, Feb. 1979.
- FREITAS, J.R.; SIGNORETTI, G.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de agentes bióticos e abióticos no acúmulo de um complexo de pigmentos e fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Gramado, 1993. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.349, 1993. Suplemento.
- FREVER, J.; BALLOU, C.E. *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoproteins. **Biochemistry**, v.24, n.3, p.753-759, Jan. 1985.
- FRY, W.E.; EVANS, P.H. Association of formamide hydrolyase with fungal pathogeninity to cyanogenic plants. **Phytopathology**, v.67, p.1001-1006, 1977.

- GABRIEL, D.; ROLFE, B. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.365-391, 1990.
- GODSHALL, M.A.; LONERGAN, T.A. The effects of sugarcane extracts on the growth of the pathogenic fungus, *Colletotrichum falcatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.30, p.299-308, 1987.
- GUSTINE, D.L.; SHERWOOD, R.T.; MOYER, B.G. Evidence for a new class of peptide elicitor of the hypersensitive reaction from the tomato pathogen *Pseudomonas corrugata*. **Phytopathology**, v.85, n.8, p.848-853, Aug. 1995.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D.; LOGEMANN, E.; NÜRNBERGER, T.; PARNISKE, M.; REINOLD, S.; SACKS, W.R.; SCHMELZER, E. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.92, n.10, p.4150-4157, May 1995.
- HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.
- HAHN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, v.62, n.1, p.107-111, July 1978.
- HAHN, M.G.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, v.68, p.1161-1169, 1981.
- HAHN, M.G.; JÜNGLING, S.; KNOGGE, W. Cultivar-specific elicitation of barley defense reaction by the phytotoxic peptide NIP1 from *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.745-754, 1993.

- HEIM, D.; NICHOLSON, R.L.; PASCHOLATI, S.F.; HAGERMAN, A.E.; BILLET, W. Etiolated maize mesocotyls: a tool for investigating disease interactions. **Phytopathology**, v.73, n.3, p.424-428, 1983.
- HIPSKIND, J.; HANAU, R.; LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of an apigeninidin acyl ester. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.381-396, 1990.
- ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman & Hall, 1992. 418p.
- JOOSTEN, M.H.A.J.; VOGELSANG, R.; COZIJNSEN, T.J.; VERBERNE, M.C.; DE WIT, P.J.G.M. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents *Cf-4* mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. **The Plant Cell**, v.9, n.3, p.367-379, Mar. 1997.
- KAMOUN, S.; YOUNG, M.; GLASCOCK, C.B.; TYLER, B.M. Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.1, p.15-25, Jan./Feb. 1993.
- KEEN, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v.24, p.447-463, 1990.
- KEEN, N.T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens ? **Science**, v.187, p.74-75, Jan. 1975.
- KELLER, H.; BLEIN, J-P.; BONNET, P.; RICCI, P. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Physiology**, v.110, n.2, p.365-376, Feb. 1996.

- KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, S.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.439-459, 1994a.
- KESSMANN, H.; STAUB, T.; LIGON, J.; OOSTENDORP, M.; RYALS, J. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.100, p.359-369, 1994b.
- KLIS, F. M. Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.
- KOBAYASHI, I.; WATANABE, H.; KUNOH, H. Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. XIV. Evidence for elicitor(s) and supressor(s) of host inaccessibility from *Erysiphe graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, n.6 , p.445-456, June 1995.
- KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.275-297, 1995.
- KUNKEL, B.N. A usefull weed put to work: genetic analysis of disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Trends in Genetics**, v.12, n.2, p.63-69, Feb. 1996.
- LEE, S-C.; WEST, C.A. Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v.67, p.633-639, 1981.
- LEITE, B.; RONCATO, L.D.B.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.235-280, 1997.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.

- LO, S.-C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.1, p.21-31, July 1996.
- LOPEZ, A.M.Q. Controle alternativo de antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wills em sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench)). Rio Claro, 1991. 203p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- LOPEZ, A.M.Q.; PASCHOLATI, S.F. Accumulation of a complex of pigments in sorghum mesocotyls in response to wounding. **Journal of Phytopathology**, v.135, n.1, p.63-70, May 1992.
- LYON, G.D.; REGLINSKI, T.; FORREST, R.S.; NEWTON, A.C. The use of resistance elicitors to control plant diseases. **Aspects of Applied Biology**, v.42, p.227-234, 1995.
- MANSFIELD, J.W.; The role of phytoalexins in disease resistance. In: BAILEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. (Ed.) **Phytoalexins**. Glasgow: Blackie, 1982. cap.9, p.253-288.
- MARTINS, E.M.F.; BERETTA, M.J.G.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, n.3, p.521-529, out. 1985.
- MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSUMECI, M.R.; BERETTA, M.J.C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. **Summa Phytopathologica**, v.2, n. 1, p.39-43, jan./mar. 1976.

- MYERS, D.F.; FRY, W.E. Enzymatic release and metabolism of hydrogen cyanide in sorghum infected by *Gloeocercospora sorghi*. **Phytopathology**, v.68, n.12, p.1717-1722, Dec. 1978a.
- MYERS, D.F.; FRY, W.E. Hydrogen cyanide potential during pathogenesis of Sorghum by *Gloeocercospora sorghi* or *Helminthosporium sorghicola*. **Phytopathology**, v.68, n.7, p. 1037-1041, July 1978b.
- NAKAJIMA, T.; BALLOU, C.E. Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7679-7684, 1974.
- NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPSKINDM J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.33, p.271-278, 1988.
- NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.84, n.16, p.5520-5524, Aug. 1987.
- NÜRNBERGER, T.; NENNSTIEL, D.; JABS, T.; RENELT, A.; SACKS, W.R.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Cell**, v.78, p.449-460, 1994.
- OKINAKA, Y.; MIMORI, K.; TAKEO, K.; KITAMURA, S.; TAKEUCHI, Y.; YAMAOKA, N.; YOSHIKAWA, M. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. **Plant Physiology**, v.109, n.3, p.839-845, Nov. 1995.

- OKUBO, Y.; ICHIKAWA, T.; SUZUKI, S. Relationship between phosphate content and immunochemical properties of subfractions of bakers' yeast mannan. **Journal of Bacteriology**, v.136, n.1, p.63-68, Oct. 1978.
- ORCZYK, W.; HIPSKIND, J.; NEERGAARD, E.; GOLDSBROUGH, P.; NICHOLSON, R.L. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase in sorghum in response to inoculation with *Bipolaris maydis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.48, n.1, p.55-64, Jan. 1996.
- OSBOURN, A.E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **Plant Cell**, v.8, n.10, p.1821-1831, 1996.
- PARKER, J.E.; SCHULTE, W.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. **Molecular Plant Microbe-Interactions**, v.4, n.1, p.19-27, Jan/Feb. 1991.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-453.
- PAXTON, J.D. Phytoalexins - a wording redefinition. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.101, p.106-109, 1981.
- PEAT, S.; WHELAN, W.J.; EDWARDS, T.E. Polysaccharides from bakers' yeast. Part IV. Mannan. **Journal of The Chemical Society**, p. 29-34, Jan. 1961.
- PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.) **The yeasts: biology of yeasts**. London: Academic Press, 1987. v.1, cap.6. p.123-180.

- PICCININ E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*). Maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucaliptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Piracicaba, 1995. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RICCI, P.; BONNET, P.; HUET, J-C.; SALLANTIN, M.; BEAUVAIS-CANTE, F.; BRUNETEAU, M.; BILLARD, V.; MICHEL, G.; PERNOLLET, J-C. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. **European Journal of Biochemistry**, v.183, n.3, p.555-563, Aug. 1989.
- ROBY, D.; TOPPAN, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M-T. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. V. Elicitors of fungal and of plant origin trigger the synthesis of ethylene and of cell wall hydroxyprolin-rich glycoprotein in plants. **Plant Physiology**, v.77, p.700-704, 1985.
- RONCATTO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Mesocótilos estiolados de sorgo: bioensaio para a caracterização de frações de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas na proteção de plantas de sorgo contra fungos. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., São Paulo, 1993. Resumos. São Paulo: Instituto Biológico, 1993. p.31.
- ROSS, F.A. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, v.14, n.3, p.340-358, July 1961.
- ROVERATTI, D. Proteção de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk. et Br por *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Piracicaba, 1989. 94p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- RUSTÉRUCCI, C.; STALLAERT, V.; MILAT, M-L.; PUGIN, A.; RICCI, P.; BLEIN, J-P. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. **Plant Physiology**, v.111, n.3, p.885-891, July 1996.
- RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v.104, n.4, p.1109-1112, Apr. 1994.
- SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISENER, H.J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.293-307, 1995.
- SCHNEIDER, M.; SCHWEIZER, P.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance in plants. **International Review of Cytology**, v.168, p.303-340, 1996.
- SHARP, J.K.; MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor inactive hexa (β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, n. 18, p.11321-11336, Sept. 1984.
- SHIBATA, N.; MIZUGAMI, K.; TAKANO, K.; SUZUKI, S. Isolation of mannan-protein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and X2180-1A5 mutant strains by the action of zymolyase-60 000. **Journal of Bacteriology**, v.156, n.2, p.552-558. Nov. 1983.
- SHIRAISHI, T.; YAMADA, T.; ICHINOSE, Y.; KIBA, A.; TOYODA, K. The role of suppressors in determining host-parasite specificities in plant cells. **International Review of Cytology**, v.172, p.55-93, 1997.

- SILVA, S.R. DA; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.99, n.2, p.159-167, 1992.
- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p.1-45, Jan. 1996.
- SMITH, D.A. Toxicity of phytoalexins. In: BAILEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. (Ed.) **Phytoalexins**. Glasgow: Blackie, 1982. cap.8, p.218-252.
- SNYDER, B.A.; LEITE, B.; HIPSKIND, J.; BUTLER, L.G.; NICHOLSON, R.L. Accumulation of sorghum phytoalexins induced by *Colletotrichum graminicola* at the infection site. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p.463-470, 1991.
- SNYDER, B.A.; NICHOLSON, R.N. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. **Science**, v.248, p.1637-1639, June 1990.
- STANGARLIN, J.R. Caracterização de sítios de infecção de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.), com base nos mecanismos de defesa vegetal. Piracicaba, 1995. 93p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v.20, n.1, p.16-21, jan./mar. 1994.
- URQUHART, E.J.; MENZIES, J.G.; PUNJA, Z.K. Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumber. **Phytopathology**, v.84, n.4, p.341-351, Apr. 1994.

- VALLENTIN, E.; HERRERO, E.; PASTOR, F.I.J.; SENTANDREU, R. Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.130, p.1419-1428, 1984.
- VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; VAN KAN, J.A.L.; DE WITT, P.J.G-M. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungi tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. **The Plant Journal**, v.2, p.359-366, 1992.
- VANETTEN, H.D.; MANSFIELD, J.W.; BAILEY, J.A.; FARMER, E.E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexin versus "phytoanticipins". **The Plant Cell**, v.6, n.9, p.1191-1192, Sept. 1994.
- VANETTEN, H.D.; SANDROCK, R.W.; WASMANN, C.C.; SOBY, S.D.; MCCLUSKEY, K.; WANG, P. Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Supl. 1, p.S518-S525, 1995.
- WEIERGANG, I.; HIPSKIND, J.D.; NICHOLSON, R.L. Synthesis of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexin in sorghum occurs independent of light. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.6, p.377-388, Dec. 1996.
- WILLIAMSON, M.A.; FOKKEMA, N.J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from apressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.91, n.6, p.265-276, 1985.
- WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p.245-258, 1991.

- YAMAOKA, N.; LYONS, P.C.; HIPSKIND, J.; NICHOLSON, R.L. Elicitor of sorghum phytoalexin synthesis from *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.255-270, 1990.
- YOSHIKAWA, M. Elicitor and the molecular bases of phytoalexin elicitation. In: DANIEL M.; PURKAYASTHA, R.P. (Ed.) **Handbook of phytoalexin metabolism and action**. New York: Marcel Dekker, 1995. cap. 11, p.61-67.
- ZLOTNIK, H.; FERNANDEZ, M.P.; BOWERS, B.; CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, v.159, n.3, p.1018-1026, Sept. 1984.

APÊNDICE 1. Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando reagente concentrado.

APÊNDICE 2. Curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores através do método de Lever.

APÊNDICE 3. Curva padrão para a determinação da molaridade de NaCl em tampão Tris-HCl pH 8,0, através do uso de condutivímetro.

APÊNDICE 4. Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,0 x 58,0 cm) de Sephacryl S-100-HR. Padrões moleculares: albumina de soro bovino (66 kDa) - 4 mg mL⁻¹, anidrase carbônica (29 kDa) - 2 mg mL⁻¹ e citocromo *c* (12,4 kDa) - 1,6 mg mL⁻¹. O volume vazio (Vo) da coluna foi determinado com azul de dextrana, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Amostras de 1 mL eluídas em Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Frações coletadas de 1 mL, a fluxo de 0,5 mL min⁻¹.