

SELEÇÃO DE LINHAGENS E OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE
Saccharomyces cerevisiae MEYEN COM PERSPECTIVAS DE
UTILIZAÇÃO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM
SOJA (*Glycine max* (L.) MERRIL)

BC/20770
IB/81316

MARIA CRISTINA MENDES COSTA

BIÓLOGA

Orientador: DRª WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

Tese apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Genética da
Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP, como um dos
requisitos para obtenção do
Título de DOUTOR em Ciências
Biológicas, área de concentração
Genética de Microrganismo.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida por (o) candidato (a)
Maria Cristina Mendes
Costa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

05/11/93



CAMPINAS

T/UNICAMP

Estado de São Paulo - Brasil
1993

C823_S

UNICAMP

UNIDADE	IB		
N.º CHAMADA:			
V.	Ex.		
TEMPO BC/	20770		
PRGO.	286/94		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRGO	CR\$ 800,00		
DATA	05/02/94		
N.º CPD			

11100000000-0

**Aos meus queridos Pais,
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A Dr^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES, que, na qualidade de orientadora, soube atender-me em todos os momentos, confiando nas minhas possibilidades de realizar este trabalho.

Ao PROF. IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO, do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio e pela permissão para usar seus laboratórios.

Ao DR. MÁRIO BARRETO FIGUEIREDO, Diretor da Divisão de Patologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo, pela revisão dos originais.

À pesquisadora SILVIA DIAS GUZZO, da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, pelo acompanhamento, sugestões e convivência amigável durante o desenvolvimento do trabalho.

À Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, por ter colocado à disposição suas dependências e a todos os seus funcionários que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Ao DR. MANOEL MIRANDA, da Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas, pelo fornecimento de sementes de soja da variedade IAC-8.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, ao Instituto Zimotécnico da ESALQ e aos Departamentos de Microbiologia e de Bioengenharia da UNICAMP, pela concessão de linhagens de *S. cerevisiae*.

Aos Professores AMAURI ALVES DE ALVARENGA e JOSÉ ABÍLIO PATTO GUIMARÃES, do Departamento de Biologia e ao Professor MOZART MARTINS FONSECA, do Departamento de Solos da ESAL, pela permissão de uso de seus respectivos laboratórios.

Ao Professor JOÃO PEGAS HENRIQUES, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, que colocou à disposição equipamentos e técnicas indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao biólogo JUVERLANDI LUGLI e ao engenheiro agrônomo RICARDO DESTEFANO, do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, pela valiosa colaboração e convivência amigável durante o curso.

Aos colegas e demais funcionários do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP pelo companheirismo durante o tempo de curso.

À família PRATA por todo o apoio, pela infra-estrutura oferecida e, especialmente, pelo carinho com que me receberam durante o tempo de permanência em São Paulo.

À minha irmã MARIA LÚCIA MENDES GOMES, pelas sugestões e pela versão para o inglês do resumo deste trabalho.

Ao FERNANDO, MARCELO e ANDRÉ, pelo incentivo, pelo auxílio, pela compreensão e pelas muitas horas que eram suas e neste trabalho foram consumidas.

À família Okano, pela convivência amigável durante os anos de residência em Campinas.

Ao biólogo RONALDO FRANCINI, pela valiosa ajuda na informatização deste trabalho.

À Professora MARIA STELLA MENDES RIBEIRO, pela revisão ortográfica e gramatical da língua portuguesa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pelos subsídios financeiros aplicados nesta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE PLANTAS E MICRORGANISMOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1. Fitoalexinas e resistência a doenças.....	05
2.2. Caracterização e presença de elicitores nas paredes celulares de fungos.....	11
2.3. Estrutura química da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Fonte de material.....	27
3.1.1. A levedura: <i>S. cerevisiae</i>	27
3.2. Manutenção do estoque do microrganismo.....	29
3.2.1. Meio de melão.....	29
3.2.1.1. Solução de sais.....	30
3.2.2. Preparo do inóculo.....	30
3.3. Identificação de mutantes.....	31
3.3.1. Meio completo.....	32

	Página
3.3.1.1. Variações do meio completo.....	32
3.3.2. Meio mínimo.....	33
3.3.3. Meio de esporulação.....	33
3.4. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	34
3.4.1. Lavado.....	34
3.4.2. Lisado.....	35
3.4.2.1. Trituração com desintegrador celular Hannover.....	36
3.4.2.2. Ultra-som.....	36
3.4.2.3. Criotrituração.....	37
3.5. CRUZAMENTOS.....	39
3.5.1. Micromanipulação.....	40
3.6. TESTES QUANTITATIVOS.....	41
3.6.1. Quantificação do teor de açúcar.....	41
3.6.2. Quantificação do teor de proteínas.....	42
3.7. PLANTA.....	42
3.7.1. Bioensaio em cotilédones de soja.....	43
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Seleção de linhagens.....	46
4.2. Obtenção das frações.....	48
4.2.1. "Lavado".....	48
4.2.1.1. Variação do teor de glicose no meio de cultura.....	48
4.2.1.2. Variação do teor de carboidratos totais do meio de cultura para crescimento das linhagens ATCC-26698 e GRF-18.....	50

	Página
4.2.1.3. Variação do teor de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" da linhagem ATCC-26698 após diferentes intervalos de tempo.....	52
4.2.2. Lisado.....	54
4.2.2.1. Definição do método de lise celular.....	54
4.2.2.2. Comparação da oscilação do teor de carboidratos em várias repetições.....	54
4.2.2.3. Seleção de linhagens e quantificação do teor de carboidratos após lise celular.....	59
4.3. CRUZAMENTOS.....	61
4.3.1. Quantificação e seleção de linhagens resultantes de cruzamento para uso em bioensaio.....	63
4.3.2. Atividade elicitora medida através de bioensaio.....	65
4.3.3. Atividade elicitora relativa das frações	68
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1. Seleção de linhagens e obtenção de frações.....	70
5.2. Considerações sobre o uso de linhagens comerciais e de laboratório.....	77
5.3. Cruzamentos e obtenção de híbridos.....	81
5.4. Atividade elicitora medida através de bioensaio.....	82
5.5. Considerações sobre a fração lisada LEV-I.....	84
5.6. Perspectivas de utilização da levedura <i>S. cerevisiae</i> no controle alternativo de doenças.....	86
6. CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE TABELAS

TABELA

Nº	Página
I	Peso fresco das linhagens ATCC-26698 e GRF-18 de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em diferentes concentrações de glicose.....49
II	Quantificação do teor de carboidratos totais solúveis do meio de cultura e do "lavado" após crescimento das linhagens ATCC-26698 e GRF-18 de <i>S. cerevisiae</i> em presença de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura.....51
III	Variação do teor de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" da linhagem ATCC-26698 de culturas de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em diferentes intervalos de tempo.....53
IV	Peso fresco em gramas das linhagens ATCC - 26698, GRF-18 e F de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em meio completo líquido (YEPD) antes de lise celular.....55
V	Teor de carboidratos totais solúveis da fração lisada da linhagem ATCC-26698, crescidas em meio completo líquido (YEPD) em quatro repetições.....57

	Página
VI Teor de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" das linhagens ATCC-26698, GRF-18 e F de culturas de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em meio completo líquido em quatro repetições.....	58
VII Teor de carboidratos totais solúveis da fração lisada de diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em meio completo líquido (YEPD).....	60
VIII Tétrades haplóides procedentes de ascos do cruzamento das linhagens GRF-18 e 665-1A de <i>S. cerevisiae</i> separadas por micromanipulação.....	62
IX Teor de carboidratos totais solúveis da fração lisada de 24 tétrades derivadas de ascos resultantes do cruzamento das linhagens GRF-18 X 665-1A de <i>S. cerevisiae</i>	64
X Atividade elicitora de frações lisadas de diferentes linhagens com diferentes teores de açúcares medida através de bioensaio em cotilédones de soja.....	66
XI Teor de carboidratos e de proteínas totais da fração lisada das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no bioensaio em cotilédones de soja.....	67
XII Atividade elicitora relativa das frações lisadas de diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> com diferentes teores de açúcares medida através de bioensaio em cotilédones de soja.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$A_{285\text{nm}}$	absorbância a 285 nanômetros
AE	atividade elicitora
AER	atividade elicitora relativa
ca.	cerca
Eq	equivalente
Hz	hertz
kc.....	quilociclos
μg	micrograma
ml	mililitros
nm	nanômetro
PAL	fenilalanina amonialiase
p/v	peso por volume
r.p.m.....	rotações por minuto
SAB	soro-albumina bovina
UV	luz ultra violeta
v/v	volume por volume
Lev-I,II	fração lisada comercial de <i>S.cerevisiae</i>

LISTA DE PLANTAS E MICRORGANISMOS CITADOS**PLANTAS**

Nome Científico	Nome vulgar
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	plátano
<i>Capsicum annuum</i> L.	pimenta doce
<i>Coffea arabica</i> L.	café
<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	soja
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	tomate
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	tabaco
<i>Petroselinum hortense</i> Hoffm.	salsa
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	feijão
<i>Pisum sativum</i> L.	ervilha
<i>Solanum tuberosum</i> L.	batata
<i>Trifolium pratense</i> L.	trevo

MICROORGANISMOS

Botrytis cinerea Pers.

Ceratocystis fimbriata (Ell. et Hals) Elliot

Colletotricum lindemuthianum (Sacc. et Magn.) Scrib.

Erwinia carotovora (Jones) Holl

Fusarium spp.

Hemileia vastatrix Berkeley et Broome

Monilinia fructicola (Wint.) Honey

Penicillium expansum Lk. ex. Thom

Phytophthora infestans (Mont.) de Barry

Phytophthora megasperma Drechs. var. *sojae* A.A Hildebrand (= *Phytophthora megasperma*

Drechs. f. sp. *glycinea* (Hildeb.) Kuan e Erwin)

Sacharomyces cerevisiae Meyen

Xantomonas campestris p v. *manihotis* (Arthaud- Berthet) Starr

SELEÇÃO DE LINHAGENS E OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE *Saccharomyces cerevisiae* MEYEN COM PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRIL)

Autora: MARIA CRISTINA MENDES COSTA

Orientador: DR^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

RESUMO

Frações lisadas de diferentes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas em bioensaio com cotilédones de soja da variedade IAC-8, com o objetivo de demonstrar o possível aproveitamento deste microrganismo em programas de indução à proteção de doenças em plantas.

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de diversos laboratórios foram quantitativamente comparadas quanto ao teor de carboidratos totais solúveis presentes

em dois tipos de fração: o "lavado" e o lisado. O uso da fração "lavado" não apresentou qualquer vantagem uma vez que os teores de açúcares encontrados foram relacionados com resíduos do meio de cultura. Testes preliminares foram executados a fim de determinar método adequado de lise celular. As amostras utilizadas no bioensaio consistiram da fração lisada e autoclavada de diferentes linhagens. As duas linhagens mais representativas do grupo foram cruzadas em laboratório e seus híbridos isolados por micromanipulação. Vinte e quatro ascósporos oriundos de seis (6) ascos diferentes constituíram o material que, após ser submetido ao teste químico de antrona, foi selecionado para o bioensaio.

A possibilidade de linhagens não-comerciais de *S.cerevisiae* serem capazes de estimular a produção diferenciada de fitoalexinas em soja foi confirmada pelo presente estudo.

Observação relevante foi a grande variabilidade do teor de carboidratos presente no lisado de híbridos resultantes do cruzamento em laboratório.

Sugere-se a introdução do teor de carboidratos como uma das características de seleção, visando à montagem de um perfil fenotípico de linhagens que atuem como elicitores de fitoalexinas em soja.

SELECTION OF STRAINS AND HIBRIDIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* MEYEN WITH PERSPECTIVES OF UTILIZATION IN THE INDUCTION OF DESEASE RESISTANCE IN SOYBEAN (*Glycine max*(L.) MERRIL).

Author: MARIA CRISTINA MENDES COSTA

Adviser: Dr^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

ABSTRACT

Lysate fractions from different strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been used in bioassay on soybean cotyledons of the cultivar IAC-8, with the purpose of demonstrating the possible utilization of this microorganism in programmes of induction of disease protection in plants.

Strains proceeding from various laboratories were quantitatively compared to the content of all soluble carbohydrates present in two kinds of fraction: the "washed" and the lysate fraction. The use of the "washed" fraction did not prove to be of any advantage since the sugar contents found in it were related to residues from the culture medium.

Preliminary assays were carried out in order to determine an adequate method of cellular lysis. The samples to be assayed consisted of the lysate and autoclaved fraction from different strains. The two most representative strains of the group were crossed in laboratory and their hybrids isolated by micromanipulation. Twenty-four ascospores derived from six different asci constituted the material which, after being submitted to the anthrone chemical test, was selected for the bioassay.

The possibility of non-commercial strains of *S. cerevisiae* being capable of stimulating differentiated production of phytoalexins in soybean has been confirmed by the present study.

Relevant observation has been made regarding the variability of all sorts of carbohydrate content present in the lysate of hybrids resulting from the crossing in laboratory.

We suggest the introduction of carbohydrate content as one of the characteristics for selection aiming at getting a phenotypic pattern of strains that act as elicitors of phytoalexins.

1-INTRODUÇÃO

Dentre os vegetais mais cultivados no mundo e, especialmente no Brasil, destaca-se a soja (*Glycine max. L*) Merrill, uma dicotiledônea da família Leguminosae, subfamília Papilionoideae e nativa da Ásia. Atualmente é cultivada em várias partes do mundo e constitui uma importante fonte de proteína e óleo vegetal.

Os Estados Unidos da América são o maior produtor e exportador de soja seguidos pelo Brasil e pela República Popular da China.

Muitas indústrias alimentícias dependem da soja como matéria prima para seus produtos, destacando-se as indústrias de óleo. O alto teor proteico de seus grãos faz da soja a base da alimentação do homem em várias partes do mundo, além de ser consumida por outros animais e usada no tratamento de perturbações orgânicas.

A soja pode substituir a carne bovina e o leite de vaca com a vantagem de seu custo ser menor, além de representar fonte de divisas para o Brasil, pois é exportada para outros países do mundo.

A economia brasileira é, portanto, extremamente dependente de uma boa safra anual de grãos de soja e, para tanto, é necessária uma boa política agrícola e, principalmente, um bom manejo de pragas e doenças. O Brasil, a cada ano que passa, aumenta sua área cultivada e, em consequência disto, tem aumentado a incidência de doenças, tanto em número quanto em severidade (Verneti, 1983).

O controle de patógenos é necessário para minimizar os desequilíbrios ambientais causados pela agricultura. Os programas de controle podem ser baseados em meios naturais ou biológicos que dependem do uso de resistência e estímulo de antagonistas como primeira linha de defesa. O uso de defensivos agrícolas está, cada vez mais, sendo combatido tanto pelos ecólogos como pelos próprios produtores, pois o custo elevado dos produtos e o seu uso indevido têm causado muitos problemas.

Os conceitos na genética da interação patógeno- hospedeiro vem sofrendo muitas mudanças com o aprimoramento das pesquisas ao longo dos anos. O enfoque dado aos mecanismos de resistência de plantas a doenças sofreu uma grande alteração depois da descoberta das fitoalexinas e, a partir daí, juntamente com o avanço da tecnologia moderna, abriu-se um canal para novos conhecimentos que, certamente, culminaram em um novo modo de encarar e entender estas interações.

A indução de proteção, ao invés do simples manejo de genes que conferem resistência ao hospedeiro, começou a ser estudada e aplicada como uma das alternativas de controle. Um dos mecanismos de resistência a doenças é a sua habilidade de acumular compostos de baixo peso molecular, tóxicos à grande maioria de microrganismos. Estes compostos, chamados fitoalexinas, geralmente não são detectados nos tecidos das plantas antes da infecção, mas são estimulados por substâncias próprias do invasor ou de microrganismos não-patogênicos. Tais substâncias que executam o papel de ativadoras de fitoalexinas foram denominadas elicitores.

Muitos pesquisadores acreditam que todas as plantas possuem potencial genético para resistência a fungos, bactérias e vírus, já que a susceptibilidade a doenças é uma exceção na natureza e a resistência, a regra (Kuc, 1972; Kuc & Rush, 1985).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen não é um patógeno de planta, mas, todavia, contém em suas paredes uma substância que atua como um elicitador de fitoalexinas. Esta substância foi identificada como uma glucana (Hahn & Albersheim, 1978) e existe em paredes celulares de diferentes fungos. Glucanas isoladas de *S. cerevisiae*, assim como de *Phytophthora megasperma* Drechs. fsp. *glycinea* (Hildb) Kuan & Erwin, mostraram-se ativas em tecidos de várias plantas, como soja (Hahn & Albersheim, 1978), feijão e batata (Cline et alii, 1978) e outras, estimulando a produção de fitoalexinas. A soja sintetiza uma fitoalexina denominada gliceolina em resposta à infecção pelo patógeno *P. megasperma*, agente causal da podridão do caule e da raiz. Glucanas isoladas das paredes do extrato comercial de *S. cerevisiae* possuem comportamento semelhante ao do patógeno *P. megasperma*, atuando como elicitador da gliceolina, quando são colocadas em contacto com os tecidos da soja.

O aproveitamento deste mecanismo biológico natural de proteção pode corresponder a um controle altamente eficiente de doenças.

O uso de fungos não patogênicos que possuam elicitores, tanto na parede como endo ou extracelularmente, constituem uma excelente ferramenta para se trabalhar no sentido de se substituir o uso de defensivos agrícolas, como os fungicidas e de se estimular, cada vez mais, o emprego na agricultura de métodos alternativos de controle, como o controle biológico e a indução de proteção.

Tendo em vista a aplicação prática da levedura *S. cerevisiae*, atuando como elicitador de fitoalexinas no mecanismo de resistência a doenças e, considerando-se o seu fácil manuseio em laboratório e a escassez de dados na literatura, o presente trabalho tem como objetivos:

1) Comparar quantitativamente polissacarídeos extraídos de diversas frações ou extratos de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a diferentes tratamentos.

2) Selecionar as linhagens de *S. cerevisiae* que apresentarem maior teor de carboidratos totais solúveis.

3) Obter, através de métodos convencionais, híbridos e/ou linhagens geneticamente melhoradas como produtoras de carboidratos.

4) Estimar a eficiência elicitora do híbrido ou linhagem melhorada pela quantificação de gliceolina produzida em cotilédones de soja.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FITOALEXINAS E RESISTÊNCIA A DOENÇAS

Em experimentos descritos por Müller & Börger, (1940), diferentes variedades de batata (*Solanum tuberosum* L.) foram inoculadas com suspensões de linhagens de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry, sendo algumas, a elas resistentes e algumas, susceptíveis. Vinte e quatro horas após , foram inoculadas com uma linhagem do fungo patogênicas a todas as variedades. Observações subseqüentes mostraram que, quando a linhagem avirulenta era usada primeiro, a segunda inoculação com uma linhagem normalmente virulenta não induzia sintomas da doença. A inibição da raça virulenta nos tecidos de batata foi interpretada, pelos autores, como sendo causada por um "princípio" ao qual deram o nome de fitoalexina.

A descoberta das fitoalexinas em interações entre parasitas e hospedeiros levou muitos pesquisadores a acreditarem que estes compostos são fatores críticos na regulação destas interações. Com o avanço das pesquisas nesta área, o conceito de fitoalexina foi se modernizando e hoje ela é definida como um composto antimicrobiano de baixo peso molecular, que tanto é sintetizado como acumulado pelas plantas, quando expostas a

microrganismos (Paxton, 1981). A teoria da fitoalexina, postulada por Müller & Börger, em 1940, serviu como uma das mais importantes hipóteses de trabalho para muitos pesquisadores desde então e um dos mais promissores campos de pesquisa dentro da fitopatologia.

Os estudos de resistência a doenças passaram a se concentrar na resistência ativa, em vez de em mecanismos dependentes apenas de barreiras estruturais, tal como a cutícula. Esta mudança levou à detecção e ao isolamento de muitos compostos antifúngicos (conhecidos coletivamente como fitoalexinas) e à sua implicação como fator determinante da resistência a doenças em muitas espécies de plantas. Apesar destas substâncias terem sido descobertas desde 1940, foi somente na década de 60, que os esforços, por parte dos fitopatólogos e bioquímicos, se concentraram a fim de se conseguir evidências suficientes a favor da referida hipótese ou contra ela.

Como resultado dessas pesquisas, muitos trabalhos na literatura se referem à produção de fitoalexinas ou de substâncias semelhantes e destas, as fitoalexinas da família Leguminosae constituem um dos mais importantes grupos, tendo sido as primeiras a serem estudadas : pisatina, faseolina, medicarpina, gliceolina e triflorizina (Ingham, 1972).

Cruickshank & Perrin (1960) isolaram a pisatina dos tecidos da vagem da ervilha (*Pisum sativum* L.), quando inoculada com *Monilinia fruticola* (Wint.) Honey, um não-patógeno da espécie e agente da podridão do pessegueiro.

Preocupados com a possibilidade de serem as fitoalexinas produtos dos parasitas e não do hospedeiro, Perrin & Cruickshank (1965), Cruickshank & Perrin (1965 a,b; 1968) estudaram a formação de pisatina em ervilha e demonstraram que reagentes químicos como metais pesados, especialmente prata, mercúrio e cobre, atuam estimulando a produção da

fitoalexina. Entretanto, os autores observaram uma dependência entre a produção de pisatina e a concentração dos reagentes. Em níveis muito baixos da substância estimuladora não havia produção da pisatina, enquanto que o aumento da concentração dos reagentes químicos elevava a sua produção ao máximo.

Foram testados fatores físicos e biológicos, como o tratamento com calor e várias espécies de fungos saprofitos, sendo relatada a formação localizada de pisatina nos tecidos inoculados e sua não - difusão pelos tecidos sadios adjacentes. A formação de pisatina foi testada qualitativamente em vários cultivares de *Pisum* spp, após a inoculação com *Monilinia fructicola*, por Cruickshank & Perrin (1965a). A capacidade de formar pisatina, após a estimulação por fungo, foi característica das variedades e das espécies de *Pisum* testadas.

A produção de um composto antifúngico pós - infectivo pelo feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi demonstrada por Müller em 1956 e denominada faseolina por Perrin, em 1964 (citado por Ingham, 1972).

Segundo Ingham (1972), a fitoalexina da alfafa foi denominada medicarpina e a triflorizina foi extraída do trevo (*Trifolium pratense* L.) por Hietala, em 1960. O mesmo autor informa que a formação de uma fitoalexina pela soja (*Glycine max* L.) Merrill foi relatada por Uehara, em 1958, quando este observou a formação de um composto fungitóxico em vagens inoculadas com *Fusarium* spp.

Em 1963, Klarman & Gerdemann também relataram a produção de uma fitoalexina pela soja inoculada com *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *sojae* A.A.Hildebrand (= *Phytophthora megasperma* Drechs.f.sp.*glycinea* [Hildeb.]). Os autores usaram uma variedade susceptível (Harosoy) e uma resistente (Illini), verificando a formação

de um extrato avermelhado produzido pela variedade resistente. Observaram, ainda, que uma variedade resistente (Harosoy 63) produz sete vezes mais fitoalexina do que a variedade susceptível (Harosoy).

Klarman & Sanford (1968) isolaram um composto da soja e sugeriram um relacionamento com a pisatina e a faseolina. A fitoalexina isolada por Klarman & Sanford possuía uma absorção máxima em U.V a 288nm, 293nm e 315nm. A indicação de ser a substância isolada relacionada à faseolina foi confirmada por Keen et al (1971) que isolaram a hidroxifaseolina de soja resistente e susceptível, inoculada com *P.megasperma* var. *sojae*.

Em 1975, Burden & Bailey reisolaram a fitoalexina produzida pela soja, fazendo uma comparação entre os dados obtidos por outros pesquisadores, verificaram que a estrutura sugerida não estava correta propondo, então, o nome de gliceolina à nova estrutura. Posteriormente, Lyne et alii (1976) e Lyne & Mulheim (1978) isolaram dois isômeros da gliceolina I que foram denominados gliceolina II e III. Em 1981, Weinstein et alii isolaram mais uma fitoalexina, glicinol, que foi isolada de tecidos de soja inoculados com *Erwinia corotovora* (Jones) Holl. Todas estas fitoalexinas mostraram-se potentes inibidores do crescimento de muitos microrganismos.

Além das fitoalexinas mencionadas, outros compostos antifúngicos já foram também, encontrados em plântulas de fava (*Vicia faba* L.). Mansfield et alii (1974) usaram microespectrografia fluorescente para confirmar que o ácido vierônico é produzido por células vivas infectadas por *Botrytis cinerea* Pers.

Entre outras famílias de plantas produtoras de fitoalexina, a família Solanaceae destaca-se por ter sido a batata (*Solanum tuberosum*) o material usado por Müller & Börger em seus experimentos clássicos que deram origem à teoria das fitoalexinas. O fungo *Phytophthora infestans* é o patógeno comumente usado em estudos de fitoalexina em batatas. Tomiyama et alii (1968) isolaram um composto fungitóxico ao qual denominaram rishitina. Dois outros foram isolados das cascas de batata por Allen & Kuc (1968) que determinaram a estrutura e a quantidade presente em tecido infectado, denominando-os α -solanina e α -chaconina. Além da batata, outros membros da Solanaceae podem também produzir fitoalexinas, como o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) que produz a rishitina e o falcarinal, o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), que produz o capsidiol. O capsidiol é, também, formado pela pimenta doce (*Capsicum annuum* L.).

Em adição às já mencionadas fitoalexinas somam-se muitas outras, totalizando, aproximadamente cento e cinquenta (150), distribuídas em dezesseis (16) famílias de plantas, a maioria delas, dicotiledônias (Ebel, 1986).

Parece estar claro que o acúmulo de fitoalexina é um fenômeno amplamente difundido na expressão de resistência localizada em interações planta-patógeno. O mecanismo de defesa, sendo um fenômeno dinâmico, ocorre somente depois que o hospedeiro e o patógeno tenham feito algum contacto fisiológico, embora a reação de defesa possa envolver barreiras estruturais ou químicas. Muitos metabólitos secundários estão presentes em concentrações suficientes para se tornarem tóxicos e úteis como barreiras químicas. Materiais estruturais, como a cutícula e a parede celular, são barreiras físicas contra a invasão. Barreiras pré-formadas não dependem da resposta da planta para impedirem a colonização de microrganismos (Ayers et alii, 1985). Kuc (1972) cita alguns fatores que participam na determinação de efeitos na interação patógeno-hospedeiro:

requerimentos nutricionais dos microrganismos, presença de substratos favoráveis para indução de enzimas, fatores que impedem a produção de toxinas ou as inativam, influência da temperatura e da luz no metabolismo da planta e do microrganismo e a rapidez e a magnitude da síntese e da degradação de fitoalexina pelo hospedeiro e pelo patógeno.

As fitoalexinas representam, portanto, apenas um dos inúmeros mecanismos de resistência a doenças em plantas e, mesmo quando parecem ser indispensáveis para a reação de defesa, certamente não são a única resposta para uma resistência efetiva (Darvill & Albersheim, 1984). Para tanto, as defesas ativas necessitam ser estimuladas. O patógeno precisa, por isto, emitir sinais que, de alguma maneira, ativem as respostas das plantas. Algumas destas moléculas sinalizadoras agem diretamente enquanto outras, como algumas enzimas, agem indiretamente, convertendo componentes da planta em moléculas-sinais. As respostas das plantas podem ser muito complexas, mas as respostas a diferentes patógenos são semelhantes. Assim, a defesa contra os muitos diferentes microrganismos com que a planta possa ter contacto é dada, não por defesas individualizadas para cada organismo, mas, antes, por um sistema muito flexível que ativa um complexo defensivo de ampla efetividade (Ayers et alii, 1985).

2.2 CARACTERIZAÇÃO E PRESENÇA DE ELICITORES NAS PAREDES CELULARES DE FUNGOS

O termo elicitor tem sido usado comumente para designar compostos que induzem ou ativam a síntese de fitoalexina em plantas. O termo foi proposto por Keen et alii (1972) para substituir o termo indutor, usado por Cruickshank & Perrin (1968). Em 1978, Yoshikawa sugeriu que fosse feita uma divisão dos elicitores em elicitores bióticos para designar compostos de origem biológica e elicitores abióticos para designar agentes de natureza física ou química de origem não biológica.

Os primeiros indícios da natureza das moléculas que estimulam o acúmulo de fitoalexinas vêm de estudos de patógenos crescidos em meio de cultura definido. Filtrados do meio de cultura de muitos patógenos elicitam o acúmulo de fitoalexinas em seus hospedeiros. Observações como esta foram feitas depois da aplicação do filtrado de cultura, utilizando-se *Monilinia fructicola* (Cruickshank & Perrin, 1968), *Penicillium expansum* (Rathmell & Bedall, 1971) e *Colletotrichum lindemuthianum* (Anderson, 1978; Anderson-Prouty & Albersheim, 1975).

O primeiro trabalho publicado que relata a purificação e a caracterização parcial de um elicitor biótico foi feito por Cruickshank & Perrin (1968). Estes autores isolaram um pequeno peptídeo, monilicolina A, do fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão de frutas. Este peptídeo ativava a síntese de fitoalexina em feijão, mesmo quando aplicado em baixas concentrações. Entretanto, a monilicolina A não estimulava a produção

de fitoalexina nem em fava nem em ervilha, mostrando ser ativa, apenas, em uma planta que não era o hospedeiro natural de *Monilia*, o agente produtor da monilicolina. Outras espécies não hospedeiras, resistentes à *M. fructicola*, não acumulam fitoalexina em resposta a este peptídeo e nenhum hospedeiro deste patógeno mostrou-se capaz de responder a este elicitor.

O sistema patógeno-hospedeiro melhor caracterizado, no qual oligossacarídeos da parede celular provaram ser elicitores de fitoalexinas, é o de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* e *sojae*. Ayers et al (1976a) foram os primeiros a purificar e a caracterizar o elicitor presente no filtrado de cultura de *P. megasperma* var. *sojae*, o agente causal da podridão da raiz e do caule da soja. Os autores fizeram uma avaliação quantitativa da atividade do elicitor através do uso de três bioensaios. Estes bioensaios utilizavam cotilédones e hipocótilos de soja, além de uma suspensão de células. O acúmulo da gliceolina em cotilédones e hipocótilos, tratados com o elicitor, foi usado como medida da sua atividade, já que ficou demonstrado existir uma relação linear entre a quantidade de gliceolina elicitada nos cotilédones e a absorbância do composto em solução a 285nm. Os trabalhos de purificação do elicitor permitiram concluir que o elicitor é um polissacarídeo constituído, predominantemente, de glucanas ramificadas que apresentam ligações 1-3. A correlação entre o grau de ramificação e a atividade biológica do elicitor sugeriu que os resíduos terminais glicosil, ligados a pontos de ramificações, estão envolvidos na atividade elicitora.

A parede celular do micélio de *P. megasperma* var. *sojae* se destacou como fonte do elicitor extracelular. Os resultados forneceram a primeira evidência de que um componente da parede celular de um patógeno estivesse implicado no mecanismo de resistência a doenças.

O fracionamento do elicitor purificado resultou em quatro frações, cada uma possuindo características químicas diferentes (Ayers et al 1976b). As quatro frações de três diferentes raças de *P. megasperma* var. *sojae* foram utilizadas para testar a habilidade elicitora de cada uma em cotilédones e hipocótilos de soja. As atividades relativas das frações de cada raça foram muito semelhantes, em cada bioensaio, confirmando: a) que os elicitores das três raças possuem atividades idênticas; b) que o procedimento de fracionamento dá resultados reproduzíveis e c) que os três bioensaios são medidas válidas da atividade elicitora. Além disso, os autores acreditam que o elicitor tem um papel tanto nas interações compatíveis quanto nas incompatíveis. Por esta razão, a presença ou a ausência do elicitor não pode determinar se uma combinação particular de soja - *P.megasperma* resultaria em uma interação compatível ou incompatível.

A estrutura química e a atividade biológica das quatro frações obtidas do elicitor purificado de *P.megasperma* foram examinadas por Ayers et alii (1976c). Os resultados mostraram que as quatro frações compartilham um componente comum, responsável pela atividade elicitora. Os autores sugeriram que este componente comum seria a glucana encontrada principalmente na fração I, sendo que a atividade de cada fração seria proporcional ao seu conteúdo de glicose.

Aproximadamente 75% das ligações glicosídicas e 90% dos resíduos glicosil do elicitor ativo foram hidrolizados e liberados pela enzima exo- β -1-3-glucanase isolada de *Euglena gracilis*, indicando, assim, que a glucana da parede micelial de *P. megasperma* var. *sojae* é, predominantemente, um polímero com ligação na configuração β .

A natureza química do elicitor de *P. megasperma* var. *sojae* foi estabelecida conclusivamente, quando se expôs os oligossacarídeos presentes no elicitor ativo à ação da

enzima β -exoglucanase altamente purificada, proveniente das paredes celulares de uma suspensão de células de soja. Esta enzima degradou os oligossacarídeos, convertendo-os em glicose e cortando sua atividade elicitora (Albersheim & Valent, 1978).

A hipótese de que o acúmulo de fitoalexina por estímulo de um elicitor representa um dos métodos pelos quais as plantas se defendem e cujo mecanismo pode ser ativado por uma grande variedade de microrganismos foi testada por muitos autores. Ebel et alii (1976) defenderam a idéia de que a síntese de fitoalexina estimulada por elicitores não é espécie-específica ou raça - específica, quando observaram que a atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e de gliceolina aumentavam em cultura de células de soja em suspensão, de salsa (*Petroselinum hortense* Hoffm) e de plátano (*Acer pseudoplatanus* L.), expostas ao elicitor de *P. megasperma*. Hahn & Albersheim (1978) isolaram um elicitor de gliceolina do extrato comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que, apesar de apresentar diferenças, divide muitas características com o elicitor isolado de *P. megasperma* var. *sojae*. Tais características incluem o fato de que o elicitor isolado da levedura pode ser separado de outras macromoléculas que contêm carboidratos, usando-se a mesma metodologia empregada para o isolamento do elicitor de *P. megasperma*. Ambos são β -glucanas com ligações 1-3; 3-6; e requerem a mesma quantidade de glucanas para elicitação da gliceolina. Isto sugere que a soja pode detectar a presença de outros fungos pelo reconhecimento de parte de suas glucanas. As glucanas estão presentes na parede celular de muitos fungos. Cline et alii (1978) testaram a atividade do elicitor isolado de *P. megasperma* var. *sojae* e do elicitor isolado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em duas outras espécies de plantas: feijão e batata. Os resultados mostraram que a habilidade de detectar e responder a algum fungo pelo reconhecimento de glucanas não é restrita à soja. O feijão e a batata, assim como a soja, respondem às glucanas purificadas, acumulando fitoalexinas,

sustentando a hipótese de que as plantas podem responder a muitas espécies de fungos pelo reconhecimento dos mesmos ou de semelhante componente da parede celular.

Yoshikawa et alii (1978; 1979) demonstraram que elicitores contidos em preparações de paredes de micélios de fungos induziam ao acúmulo de gliceolina em tecidos de soja de uma maneira semelhante àquela que ocorre em tecidos infectados evidenciando o envolvimento dos elicitores "in vivo". Yoshikawa et alii (1981) observaram, também, que os cotilédones da soja continham atividade enzimática, que liberava elicitores em água de paredes celulares isoladas de *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. O elicitor ativo era liberado imediatamente após o contacto com os tecidos da soja, sugerindo que tal elicitor poderia ser responsável pela iniciação do acúmulo de fitoalexina em plantas infectadas e, portanto, importante nos estágios iniciais da interação parasita-hospedeiro.

Concomitantemente às publicações referentes a elicitores de natureza polissacarídica, a intensa investigação a que se submeteu todo e qualquer sistema parasita-hospedeiro culminou na descoberta de elicitores das mais variadas composições químicas.

Hahn et al (1981) extraíram das paredes celulares da soja um elicitor rico em ácido galacturônico com pequenas quantidades de ramnose e xilose que eles denominaram de elicitor endógeno. A preponderância do ácido galacturônico sugeriu ser o elicitor endógeno, um polissacarídeo péctico. Este elicitor endógeno foi encontrado em todas as paredes celulares das plantas examinadas e, por isto, levantou a questão do seu provável papel na interação entre plantas e patógenos. A descoberta de que o elicitor endógeno é um fragmento de polissacarídeos da parede celular sugeriu que a complexidade estrutural destes pode ser usada na codificação de mensagens biológicas.

Dentre tantas evidências apontando para a inexistência de especificidade nas relações parasita-hospedeiro, Keen, já anteriormente (1975), relatou a ocorrência de um elicitor específico das raças 1 e 2 de *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, observando a formação de metabólitos em filtrados de cultura destas raças que elicítavam maiores níveis de gliceolina no cultivar Harosoy 63 de soja (resistente) do que no cultivar Harosoy (susceptível). Observou ainda, que filtrados de cultura da raça 3, virulenta a ambos cultivares, estimulavam a formação dos mesmos níveis de gliceolina, nos dois cultivares. O autor concluiu que tais metabólitos seriam responsáveis pela especificidade no hospedeiro, controlando a biossíntese de fitoalexina.

Ziegler & Albersheim (1977) purificaram diferentes tipos de invertase presentes no meio de cultura das raças 1, 2 e 3 de *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Estas enzimas mostraram ser compostas por 25% de carboidratos. Manose e glucosamina compreendiam 97% dos carboidratos das três raças analisadas, mas a relação entre manose e glucosamina foi claramente diferente para cada raça, demonstrando diferenças quantitativas entre os componentes glicosil das diferentes raças. A existência de carboidratos raça-específicos, sugeriu que estes carboidratos pudessem estar envolvidos na determinação da especificidade nas interações parasita-hospedeiro.

Em continuidade à idéia de especificidade, Keen & Legrand (1980) mostraram que glicoproteínas da parede celular de *P. megasperma* elicítavam gliceolina com a mesma especificidade das raças dos fungos das quais elas foram obtidas. Concluíram, então, que as glicoproteínas estavam presentes na superfície da parede celular do fungo e reforçaram a hipótese de que a raça - especificidade no sistema soja-*P.megasperma* f.sp. *glycinea* pode ser determinada pelo reconhecimento específico, pela planta, das glicoproteínas superficiais do fungo.

Ziegler & Pontzen (1982) demonstraram que a invertase, anteriormente referida, inibia o acúmulo de gliceolina sendo, esta inibição, raça - específica. Estes resultados são consistentes com aqueles de Keen & Legrand (1980). O trabalho de Ziegler & Pontzen foi mais além, possibilitando a diferenciação entre a ação da glucana e da invertase glicoprotéica, sugerindo que a elicitação de gliceolina seria um processo não-específico e que os níveis diferentes de acúmulo de gliceolina, em interações compatíveis e incompatíveis, são determinados pela inibição específica deste evento não-específico por uma glicoproteína composta por manana.

Os autores anteriormente citados sustentaram a idéia de que não é a reação de resistência (alto acúmulo de gliceolina), mas a de susceptibilidade (supressão do acúmulo de gliceolina) que é especificamente induzida no hospedeiro pelo patógeno, sendo este tipo de associação encontrado em outros sistemas parasita- hospedeiro (Doke et al, 1979; Garas et al, 1979). Os autores mostraram, também, que a estrutura responsável pela supressão do acúmulo de gliceolina na planta hospedeira está, provavelmente, localizada na porção de carboidrato da molécula.

À vista do fato de que vários carboidratos com atividade elicitora já foram isolados do fungo *P. megasperma* f.sp. *glycinea*, Keen et al (1983a) empreenderam um estudo para caracterizar o carboidrato liberado pela endoglucanase da soja, comparar a atividade elicitora de vários polissacarídeos, até então isolados, com carboidratos estruturalmente relacionados e definir qual elicitor é, provavelmente, de maior significância fisiológica na interação planta-patógeno. Os autores extraíram uma glucomanana das paredes celulares da soja, com a enzima β - 1.3 - endoglucanase, que provou ser o elicitor mais ativo até então isolado. Este era, aproximadamente, dez (10) vezes mais ativo em cotilédones de soja do que a fração β -glucana extraída das paredes celulares, além de ter

atividade raça-específica em hipocótilos de soja. Todos os carboidratos isolados das paredes celulares de *P.megasperma* possuíam atividade elicitora, mas outras glucanas, glucomananas e mananas de outras fontes, foram muito menos ativas. As glucomananas foram consideradas, pelos autores, o elicitor fisiológico mais importante na rápida interação que ocorre entre as células da soja e as hifas do fungo.

A enzima β -1-3-endoglucanase foi purificada e caracterizada por Keen & Yoshikawa (1983b), partindo do princípio de que cotilédones de soja continham uma atividade enzimática. Esta atividade liberava elicitores, solúveis em água, de paredes celulares isoladas do fungo *P.megasperma*, sendo que nos tecidos da soja, os fatores liberados eram elicitores eficientes de gliceolina. Os resultados sugeriram, para os autores, que o papel das carbohidrases da planta envolve a liberação de um elicitor ativo da superfície celular do patógeno e que receptores para os carboidratos com atividade elicitora existem na membrana plasmática das plantas.

Yoshikawa et al (1983) encontraram um receptor na membrana da soja para a micolaminarana que é um elicitor não - específico, sugerindo que este fato levantaria a possibilidade de que os receptores poderiam, também, existir na soja e em outras plantas para elicitores que possuíssem propriedades raça- específicas. As observações levaram à sugestão de que os sítios de ligação da membrana são receptores específicos para a micolaminarana, que estão fisiologicamente envolvidos na iniciação da produção de fitoalexina nos cotilédones de soja. O receptor sugerido é, provavelmente, uma proteína ou uma glicoproteína.

Schmidt & Ebel (1987) relataram a existência de sítios de ligação nas membranas celulares da soja para uma fração de β -glucana derivada de *P. megasperma*. Esta fração era quatrocentas (400) vezes mais ativa do que a micolaminarana.

Cosio et alii (1988) estudaram a especificidade destes sítios de ligação, usando uma variedade de poliglucanas e oligoglucanas de origem fúngica. Os autores mostraram a existência de uma correlação direta entre a atividade elicitora e a afinidade da ligação entre as classes de oligoglucanas obtidas por hidrólise parcial de polissacarídeos da parede celular de *P. megasperma*.

O menor fragmento de β -glucana com atividade elicitora e derivado da parede celular de fungos, foi purificado e caracterizado como sendo um hexa- β -glicosídeo (Sharp et al, 1984 b e c). Este hexaglucosídeo foi purificado a partir de uma complexa mistura de oligossacarídeos, liberados por hidrólise ácida parcial de paredes celulares do fungo *P. megasperma* f. sp. *glycinea* e, subsequentemente, reduzido. Foi mostrado que a atividade elicitora do hepta- β -glicosídeo é idêntica à atividade do hepta- β -glicosídeo não reduzido correspondente. São ativos em concentrações entre 10^{-7} e 10^{-9} . Isto faz com que se tornem os elicitores mais ativos de produção de fitoalexina já isolados. A estrutura deste hepta- β -glicosídeo foi confirmada por síntese química (Sharp et al, 1984 a). O hexa- β -glicosídeo foi o único componente ativo em uma mistura de trezentos (300) hexaglucosídeos (Sharp et al, 1984 c). Outros sete hexa- β -glicosídeos não induziram à produção de fitoalexina. Estes resultados tornaram evidente que existem requerimentos estruturais definidos para que um oligo- β -glicosídeo seja um elicitor efetivo de fitoalexina na soja.

Cheong & Hahn (1991) demonstraram a existência de um sítio de ligação para o elicitor hepta- β -glucosídeo nas membranas microssomais da soja e que este sítio de ligação tem propriedades características de um receptor fisiológico efetivo. Os resultados sugeriram, aos autores, que este sítio de ligação deve ser uma proteína ou uma glicoproteína.

Com o objetivo de identificar quais seriam os elementos estruturais chaves do elicitor ativo hepta- β -glucosídeo para se ter a elicitação da fitoalexina na soja, Cheong et al (1991) empreenderam um estudo químico detalhado de sua estrutura. Utilizaram onze (11) oligo- β -glucosídios sintéticos relacionados estruturalmente com o hepta- β -glucosídeo ativo. Os resultados dos bioensaios em cotilédone de soja estabeleceram que o oligo- β -glucosídeo, para ter a sua máxima atividade, deve possuir uma estrutura específica de $\beta(1-6)$ com ramificações $\beta(1-3)$, essenciais para desencadear a síntese "de novo" das enzimas que regulam a rota metabólica da produção de fitoalexina na soja.

Ryan & Farmer (1991) concluem que os eventos de reconhecimento, empregando oligossacarídeos definidos, indicam que os oligossacarídeos interagem com receptores da membrana de uma forma semelhante a hormônios para afetar a regulação gênica e que estudos sobre oligossacarídeos, que atuam como sinais para ativar processos de defesa nas plantas, continuarão a ser publicados na literatura.

2.3 ESTRUTURA QUÍMICA DA PAREDE CELULAR DE *S.cerevisiae*

A estrutura superficial dos fungos, a parede celular, tem atraído a atenção não só dos micólogos mas, também, de pesquisadores de outras disciplinas biológicas. A parede celular tem sido estudada sob diferentes aspectos e estes estudos tem contribuído para um melhor entendimento de vários fenômenos biológicos relacionados à superfície assim como nas interações moleculares planta-patógeno.

As interações moleculares entre as superfícies celulares das plantas hospedeiras executam um importante papel no controle da patogênese e na resistência a doenças. De um lado, a planta hospedeira tem que ser capaz de detectar ou de reconhecer um patógeno em potencial como estranho e usar este ato inicial de reconhecimento para ativar mecanismos de resistência induzida.

Por outro lado, um patógeno em potencial requer a habilidade de reconhecer aqueles caracteres da planta que sinalizam a receptividade da planta ao parasita. Na superfície foliar, por exemplo, esporos de fungos saprófitos e parasitas podem ser encontrados em abundância, mas somente aqueles da espécie parasita podem penetrar e causar a doença. A espécie parasita não só possui os genes necessários para a patogenicidade, mas, através de vários sinais chave, ela pode detectar a presença da planta hospedeira e usar estes eventos de reconhecimento para modular ou controlar a expressão dos mecanismos de patogênese (Callow et al, 1987).

As propriedades da parede celular dos fungos, tais como força mecânica, atributos morfológicos e atividade biológica, são, indubitavelmente, baseadas em suas constituições químicas particulares. A parede celular é composta por 60-90% de polissacarídeos, o restante consistindo de proteínas, lipídeos, ocasionalmente melanina, fosfatos e sais inorgânicos. Os polissacarídeos são compostos de açúcares aminados, hexoses, ácidos hexurônicos, metilpentoses e pentoses. Glucose e N-acetil-D-glucosamina usualmente representam os elementos químicos polissacarídeos do esqueleto da parede, tais como quitina, celulose, β -glucanas e glucanas. Os outros açúcares estão presentes principalmente na forma de vários homo ou heteropolissacarídeos, sempre em complexos químicos com proteínas. O nome genérico "glucanas" cobre um grande grupo de polímeros de D-glucose que se diferenciam tanto no tipo quanto nas proporções relativas das ligações glicosídicas individuais (Farkas, 1979).

Em *S. cerevisiae*, especificamente, a parede celular é um complexo contendo glucanas, mananas, pouca quantidade de quitina, fosfato e proteínas (Manners et alii 1973b).

A análise estrutural das glucanas foi dificultada por sua relativa insolubilidade. Northcote, em 1962, (citado por Duffus et al, 1982), descreveu a composição química da parede celular como contendo 30% de glucanas; 30% de mananas; 10-15% de proteínas; 8-9% de lipídeos e 1-2% de quitina. Estes resultados não levaram em conta a presença de 20% de uma glucana álcali-solúvel, que só foi reconhecida em 1970, apesar de já se ter conhecimento de sua presença. O conteúdo verdadeiro das glucanas, portanto, é de aproximadamente 50%, dependendo das linhagens da levedura utilizada e dos métodos utilizados na preparação e no fracionamento da parede celular (Duffus et al, 1982).

Os primeiros estudos da estrutura química das glucanas foram feitos utilizando-se a fração alcali-insolúvel. Segundo Phaff (1963), a preponderância de ligações β -1-3 neste polímero de glucose foi estabelecida ainda na década de 30 e sua polimerização estimada em 28-40 graus.

Entre 1950-1960, surgiram opiniões diferentes quanto a estrutura das glucanas insolúveis. Informa Duffus (1982) que Bell & Northcote em 1950, sugeriram uma estrutura altamente ramificada com cadeias curtas contendo nove (9) resíduos de glucose ligados na posição 1-3 e interligados por 11% de ligações glicosídicas 1-2. E, contrastantemente, Peat et alii em 1958, usando hidrólise ácida parcial, concluíram que a glucana era linear e continha certas sequências de glucose (1-3) e (1-6) ligadas na configuração β . A presença de aproximadamente 10-20% de ligações 1-6 foi confirmada por análise química dos grupos hidroxil primários. A hidrólise parcial com 90% de ácido fórmico produziu glucose, gentiobiose, laminaribiose, gentiotriose, além de outros açúcares.

Assim, duas estruturas foram propostas: a) uma molécula linear, contendo um arranjo ao acaso de ligações; b) blocos de glucose (1-6) ligados e interligados, em ambos os lados, por resíduos de glucose (1-3). Na tentativa de resolver estas diferenças, Manners & Patterson (1966), através de metilação, oxidação de periodato e estudos de degradação enzimática, concluíram que a glucana da levedura possuía uma estrutura ramificada que continha cadeias principais de resíduos de β - glucose ligados na posição 1-6, aos quais estavam ligados cadeias laterais de β -glucose ligados na posição 1-3.

Bacon & Farmer (1968) mostraram que a glucana da levedura preparada da forma como descrita, ou seja, extraída com alcali a quente ou ácido acético, era heterogênea e continha um polissacarídeo solúvel em ácido acético que, por hidrólise parcial e

espectroscopia infra - vermelha, mostrou ser uma glucana na configuração β , com ligações 1-6. A afirmação dos autores acima citados, de que a glucana da levedura era, de fato, uma mistura de um componente principal constituído por uma β - glucana (1-3) e um componente secundário constituído por uma β - glucana (1-6) serviu como explicação para muitos dos resultados anteriormente apresentados. Estudos subsequentes mostraram a presença de uma membrana composta por quitina e glucana que, quando intacta, agia como uma membrana semipermeável impedindo a saída da glucana interior (Bacon et alii, 1969).

A descoberta significativa feita por Bacon & Farmer (1968) levou ao fracionamento detalhado da parede celular da levedura e a uma caracterização química dos componentes resultantes, ou seja, β -glucanas (1-3) e (1-6) (Manners et al 1973 a, b.). O componente principal (85%) era uma β -glucana (1-3) levemente ramificada, de alto peso molecular (240.000 daltons) e contendo cerca de 3% de ligações (1-6) β -glicosídicas entre cadeias (Manners et al 1973 a). O componente secundário (15%) tinha um peso molecular de 22.000 daltons e alta proporção de ligação (1-6), (65%), junto com um pequeno número de ligações (1-3), que estavam presentes tanto como interesíduo (5%) como intercadeia (14%) (Manners et al, 1973 b). A molécula era altamente ramificada, possuindo 16% de grupos não-redutores terminais. Estes resultados analíticos se aplicam somente a glucanas de um exemplar particular da levedura tendo os autores enfatizado que as preparações de diferentes cepas de levedura podem diferir na proporção relativa dos dois (2) componentes sendo que os componentes individuais podem variar, consideravelmente, no grau de ramificação e em outros parâmetros estruturais. A heterogeneidade das glucanas foi confirmada em estudo de preparações de diferentes espécies de leveduras. Estudos quantitativos em quatro (4) espécies sugeriram que a quantidade de glucana β .(1-6) era maior do que em *S.cerevisiae* (Manners et alii, 1974).

Sabendo da ocorrência de um terceiro componente da parede celular da levedura, Fleet & Manners (1976) desenvolveram um estudo detalhado com o objetivo de saber a estrutura molecular desta glucana álcali-solúvel. Uma glucana álcali-solúvel foi obtida da parede celular de uma linhagem específica de *S.cerevisiae*, pela extração a frio, com hidróxido de sódio diluído. A glucana, que representava cerca de 20% da parede celular, era homogênea. Foi revelada a presença de 80-85% de ligações β -D-(1-3); 8-12% de β -D-(1-6) e 3-4% de resíduos ramificados ligados aos carbonos C-1, C-3, C-6. O peso molecular da glucana foi estimado em 250.000 daltons. Um exame com microscopia eletrônica, depois da extração, mostrou que uma camada amorfa foi removida, revelando numerosas marcas estruturais de brotos celulares.

Na tentativa de examinar a estrutura fina da glucana anteriormente descrita, Fleet & Manners (1977) submeteram-na à degradação enzimática. Uma linhagem de *S.cerevisiae* foi hidrolizada com as enzimas purificadas, endo-(1-3) β -D-glucanase e endo-(1-6)-D-glucanase de *Bacillus circulans*. Os produtos da ação enzimática incluíram vários oligossacarídeos e polissacarídeos que foram separados e caracterizados por filtração em gel, dando novas informações sobre a sua estrutura.

Os autores demonstraram a presença de uma macromolécula de β -glucana (1-3), com baixo grau de ramificação (2.0%) e contendo ocasionalmente resíduos ligados (1-6). A este esqueleto estão ligadas várias cadeias laterais contendo, principalmente, resíduos ligados (1-3) ou resíduos (1-6), ou mistura de ambos.

Esta glucana sempre continha um fragmento de manana que podia ser liberado pela ação da enzima endo-(1-6)- β -glucanase. O relacionamento biológico entre as glucanas álcali-solúveis e álcali-insolúveis não foi estabelecido até então.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- FONTE DE MATERIAL

3.1.1- A LEVEDURA: *Saccharomyces cerevisiae*

O material utilizado no presente trabalho constituiu-se de linhagens de *S.cerevisiae* pertencentes a coleções de diferentes laboratórios. Os Departamentos de Ciências dos Alimentos e de Bioengenharia da UNICAMP contribuíram, na fase de implantação do projeto de tese, fornecendo as primeiras linhagens do estoque inicial. Posteriormente, o Instituto Zimotécnico (IZ) da ESALQ, bem como o Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, cederam as demais linhagens utilizadas no decorrer dos experimentos.

A levedura da espécie *S.cerevisiae* se classifica na Sub-divisão: Ascomycotina; Classe: Hemiascomycete; Ordem: Endomycetales; Gênero: *Saccharomyces*; Espécie: *S.cerevisiae*.

As seguintes linhagens são procedentes do Departamento de Ciências dos Alimentos e de Bioengenharia da UNICAMP (Campinas);

S. cerevisiae ATCC. 26698

S. cerevisiae CBS. 1171

S. uvarum IZ. 785

S. cerevisiae IZ. 888

S. cerevisiae IZ. 1904

S. cerevisiae IZ.761

S. cerevisiae IZ. 1348

S. cerevisiae M. 300A

S. cerevisiae M.304-2

S. cerevisiae IZ. 765

S. ellipsoideus IZ. 608

S. diastaticus EA. 064

Levedura de cerveja CWE

Linhagens de *S.cerevisiae* procedentes do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP:

IL. 1783- Mat a; trp₁, leu₂, ura₃, his₄.

IL. 1784- Mat α ; trp₁, leu₂, ura₃, his₄.

IL. 1788- Mat a/ α ; trp₁, leu₂, ura₃, his₄.

GRF-18- Mat α ; leu₂, his₃.

AH-22- Mat a; leu₂, his₄.

TD-20- Mat a; his₄, ura₃, trp₁.

DCG- Mat α ; leu₂₋₃, his₄, can₁.

D645- 6D- Mat a; mal, lys₂, trp₁.

D517- 4B- Mat a; ade₂, lys₉.

D665-1A- Mat a; mal

D585-11C- Mat a; lys₁.

C1- Mat a; lys₂, trp₁.

C2- Mat α ; lys₂, leu₂.

D645-4B- Mat a; his₄, leu₂ mal, hys₂, ade.

As linhagens procedentes do Instituto Zimotécnico, por se apresentarem em estado insatisfatório de conservação, foram descartadas logo no início dos experimentos.

3.2 MANUTENÇÃO DO ESTOQUE DO MICRORGANISMO

Todas as fases preliminares do experimento, desde a coleta da primeira linhagem a ser testada até a obtenção da fração denominada "lavado", foram desenvolvidas no laboratório do Prof. Ivanhoé Baracho, no Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

Para o crescimento e manutenção das linhagens do estoque inicial, ou seja, das linhagens cedidas pela UNICAMP e pelo Instituto Zimotécnico, optou-se por usar o meio de melação, por ser de baixo custo. O melação utilizado foi cedido pela usina de açúcar Ester, Município de Cosmópolis (S.P.) e os açúcares redutores totais (ART) quantificados em 63,32%. A concentração do açúcar no meio foi ajustada para 2%(v/v) e uma solução de sais a 1% (p/v) foi acrescentada, constituindo-se no meio de melação cuja fórmula é dada a seguir:

3.2.1 MEIO DE MELAÇÃO

Melação	2%
Solução de sais	1%
Agar	2%

3.2.1.1 SOLUÇÃO DE SAIS

Fosfato de amônio monobásico	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	50g/l
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,5g/l
Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,8g/l
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,12g/l

O desenvolvimento das culturas da levedura se deu em meio sólido (melaço ou YEPD), em placas de Petri, incubadas em estufa com temperatura controlada de 30°C . Após o crescimento por quarenta e oito (48) horas, foram mantidas em geladeira a 5°C e repicadas a cada trinta (30) dias.

3.2.2 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo foram utilizadas culturas novas de vinte e quatro (24) horas. Partindo-se da cultura em meio sólido, tomou - se uma pequena quantidade do material com alça de platina e inoculou-se em meio líquido . Os frascos foram incubados em mesa giratória a 30°C, por 24 h, constituindo-se no pré-inóculo. Do pré-inóculo transferiu-se 1ml para frascos de Erlenmeyer, contendo meio líquido que foram novamente incubados em mesa giratória a 30°C, por 24 h.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES

Com o objetivo de detectar e selecionar as linhagens portadoras de marcadores genéticos, o trabalho foi conduzido no sentido de caracterizar os possíveis mutantes. Para tanto, fez-se uma bateria de testes, utilizando-se meios de cultura com diferentes fontes nutritivas. As linhagens utilizadas nestes testes foram as procedentes da UNICAMP. Muitas linhagens não apresentaram crescimento em meio mínimo, revelando serem deficientes em aminoácidos. O trabalho de identificação dos mutantes auxotróficos para aminoácidos foi prejudicado graças ao crescimento residual persistente apresentado por várias linhagens, o que comprometeu o diagnóstico correto da deficiência. Este fato levou ao abandono do método convencional para auxotrofia em placas de Petri com meio sólido em favor da utilização de meio líquido. O preparo do inóculo foi executado conforme item 3.2.2.

Os testes passaram a ser feitos, então, em meio mínimo líquido, com leitura por turbidimetria (medida de turvação) a fim de se descartar o problema do crescimento residual. Efetuou-se a turbidimetria em espectrofotômetro (Pekin-Elmer, Coleman 295), em comprimento de onda de 610nm. A compensação foi feita com o meio de cultura utilizado, porém, estéril. Foram feitas seis (6) combinações diferentes de seis (6) aminoácidos em cada frasco. Uma linhagem controle permitiu a comparação dos resultados. As linhagens que não responderam satisfatoriamente aos testes, como as da UNICAMP e as do Instituto Zimotécnico da ESALQ , foram abandonadas. Outras linhagens foram procuradas em laboratórios, cuja manutenção permitisse maior confiabilidade em relação à pureza do material e que, também, já possuíssem grupo de compatibilidade determinado. As linhagens da USP passaram a ser utilizadas, juntamente com a linhagem controle ATCC 26698,

procedente da UNICAMP. Os meios de cultura utilizados no decorrer do experimento são dados a seguir:

3.3.1 MEIO COMPLETO (YEPD)

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Agar	2%

3.3.1.1 VARIAÇÕES DO MEIO COMPLETO

Glicose	1%
Glicose	0,2%
Glicose	0,1%
Glicose	0,02%
Glicose	0,01%
Glicose	0,0%

3.3.2 MEIO MÍNIMO

Base nitrogenada de levedura (Wo aacs)	0,6%
Glicose	2%
Agar	2%
pH	6.5

3.3.3 MEIO DE ESPORULAÇÃO

Acetato de potássio	1%
Extrato de levedura	0,1%
Dextrose	0,05%
Agar	2%.

3.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

As linhagens de levedura foram submetidas a dois (2) tipos de tratamento, com a finalidade de se verificar a variabilidade com relação à quantidade de polissacarídeos totais solúveis: lavagem superficial das células que constituiu a fração denominada "lavado" e lise celular, que constituiu a fração denominada "lisado".

3.4.1 "LAVADO"

Em frascos de Erlenmeyers de 100ml, contendo 50ml de meio completo (YEPD) líquido, foi inoculada (conforme item 3.2.2) uma linhagem controle da levedura (ATCC 26698). Estes frascos foram deixados sob agitação durante 24 h a 30°C com iluminação natural e, após centrifugação (3.000 r.p.m) por dez (10) minutos para retirada do meio de cultura, as células foram lavadas com água destilada por duas (2) vezes consecutivas e o volume, completado para 50ml. Uma alíquota de 1,5ml foi, então, retirada e, a partir daí, as células foram deixadas em agitação, em câmara fria (6°C±2). Em intervalos de tempo determinados, 0, 1/2, 2, 6, 10, 24, e 48 h foram sendo retiradas alíquotas para posterior análise da presença de açúcar. As alíquotas retiradas foram submetidas a um teste colorimétrico de antrona e o teor de açúcar quantificado.

A fração extracelular derivada da lavagem das células foi submetida a uma série de testes com o objetivo de se esclarecer: 1) se a quantidade de açúcares presente no "lavado" era resíduo do meio de cultura ou se era devido a polissacarídeos excretados pelas células; 2) se a quantidade de açúcar colocada no meio de cultura era total ou parcialmente consumida; 3) qual o percentual de oscilação existente no conteúdo de açúcar em várias

repetições; 4) qual a porcentagem mínima de carboidratos necessária para o crescimento normal da levedura.

Estes testes foram feitos utilizando-se a linhagem ATCC-26698 e uma linhagem duplo - mutante (GRF-18) para aminoácidos. O inóculo foi preparado de acordo com o item 3.2.2 e as linhagens crescidas em meio líquido de YEPD a 30°C, sob agitação. Após o crescimento por 24 h, retirou-se o meio de cultura por centrifugação e, utilizando-se o teste colorimétrico de antrona, quantificou-se o teor de açúcar do meio. O mesmo foi feito com a fração derivada da 1° e da 2° lavagem das células (lavado). Para se verificar a porcentagem ideal de carboidratos para o crescimento da levedura, variações do teor de glicose do meio de cultura foram feitas (conforme item 3.3.1.1).

3.4.2 LISADO

Os testes descritos a seguir foram executados na seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

Com o objetivo de se estabelecer um método de lise celular que pudesse ser utilizado com eficiência, foram empregados, inicialmente, três procedimentos diferentes, cujos resultados foram comparados ao microscópio. Usando-se a mesma linhagem de levedura, as células foram submetidas a: 1) trituração com desintegrador celular tipo Hannover (bastão de vidro esmerilhado); 2) ultra-som (Sonorex; mod. RK 103) e 3) criotrituração. O método considerado mais eficiente foi utilizado tanto para as linhagens cedidas pelos laboratórios da USP e da UNICAMP quanto para aquelas oriundas de cruzamentos feitos em laboratório.

3.4.2.1 TRITURAÇÃO COM DESINTEGRADOR CELULAR HANNOVER

Este método consistiu na utilização de um aparelho elétrico composto por um bastão de vidro esmerilhado, que executa um movimento rápido de baixo para cima e vice-versa, dentro de um recipiente de vidro, extremamente justo ao bastão. Uma amostra (10ml) da linhagem controle da levedura, crescida em meio completo líquido, foi colocada no recipiente de vidro. Com o aparelho em funcionamento, o líquido contendo as células era deslocado, rapidamente, com o movimento do bastão, que funciona como uma prensa, esmagando as células contra a parede do vidro. O aparelho foi deixado em funcionamento por períodos de tempo variados e o resultado monitorado ao microscópio.

3.4.2.2 ULTRA - SOM

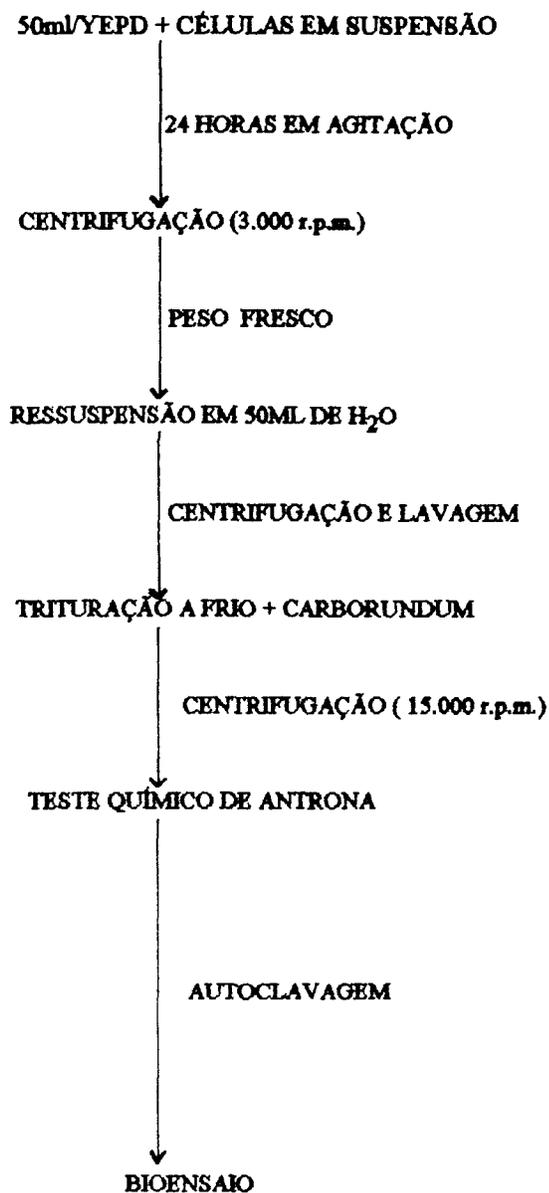
Utilizou-se um aparelho de ultra - som Sonorex, mod. RK 103 cuja potência é de 50-60 HZ. Colocou-se a amostra (10ml) a ser testada em um recipiente de vidro e este, dentro do aparelho. Em seguida, o aparelho foi ligado e deixou-se por tempos variados até um total de trinta (30) minutos. Os resultados foram observados ao microscópio.

3.4.2.3 CRIOTRITURAÇÃO

Após o crescimento da levedura em 50ml de meio completo, por 24 h sob agitação a 30°C, as células foram submetidas à centrifugação (3.000 r.p.m.) para retirada total do meio de cultura. A massa celular foi acrescida de uma pequena quantidade de carborundum (limalha de ferro extremamente fina, de 200-400 mesh) e de 1ml de água destilada para trituração mecânica, durante 1 h em presença de nitrogênio líquido. A trituração foi executada em cadinho de porcelana e para cada linhagem a ser testada foram feitas três (3) repetições. Terminado o tempo de trituração, as células foram acrescidas de 4ml de água destilada e submetidas à centrifugação (15.000 r.p.m.), por 15 min, em ultracentrífuga refrigerada (Heraeus-Christ.GMBH Osterode), para retirada dos restos celulares e do carborundum. O volume do sobrenadante foi, então, ajustado para 50ml com água destilada. O líquido resultante deste método consistiu nas amostras de levedura que foram autoclavadas e congeladas e cujo teor de açúcar foi determinado por teste colorimétrico de antrona. Um resumo esquemático do procedimento de obtenção das diferentes amostras pode ser visualizado no esquema apresentado a seguir.

O crescimento das linhagens foi medido e comparado pelo peso fresco da levedura, após retirada total do meio de cultura por centrifugação (3.000 r. p.m), durante 10 min.

**REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO EMPREGADO
PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO LISADA DE LINHAGENS DE *S. cerevisiae*.**



3.5 CRUZAMENTOS

Os cruzamentos e a micromanipulação foram executados no laboratório do Professor J. P. Henriques, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em Porto Alegre, durante o mês de março de 1991.

A linhagem D665-1A mat a foi cruzada com a GRF-18 mat α e ambas, cruzadas com a linhagem ATCC-26698. Linhagens a serem cruzadas foram inoculadas sobre a superfície da placa de Petri com YEPD onde foram misturadas com o auxílio da ponta de um palito "português," previamente esterilizado. Em seguida, a placa foi incubada por 3 a 4 h a 37°C. Durante este tempo de incubação, as células formam pares de conjugação e podem formar diplóides. O aparecimento dos zigotos foi monitorado ao microscópio. Após o reconhecimento dos mesmos, fez-se uma estria com a ponta de um palito esterilizado em uma lâmina de vidro contendo uma camada extremamente fina de meio completo (10ml por placa). Pela técnica de micromanipulação, utilizando-se um micromanipulador E. Leitz, separou-se zigotos, deixando-os em incubação por dois a três dias. Com o desenvolvimento de uma pequena colônia, as células foram transferidas para o meio de esporulação e a placa incubada por mais dois a três dias, a 37°C. Durante este período de incubação, as células diplóides ou zigotos entram em meiose, produzindo quatro (4) células haplóides, cobertas por uma membrana, formando o asco. A digestão parcial dos ascos foi feita com a enzima β -glucuronidase (Sigma- typeHp2 de *Helix pomatia* crude solution) que foi preparada misturando-se 0,5ml de sorbitol 1M e 0,03ml da enzima (100.000 unidades /ml a pH 5) e incubando-se por 15 min, a 37°C. Depois, preparou-se algumas lâminas, fazendo-se uma estria com a ponta de um palito esterilizado, no sentido vertical, a fim de se separar os esporos. A lâmina de vidro utilizada no micromanipulador diferencia-se das demais por possuir, em uma de suas extremidades, bordas de vidro de

cerca de 1 cm de altura de modo que a sua colocação de cabeça para baixo permita que a agulha, acoplada ao aparelho, possa tocar o meio de cultura através de ajustes laterais e inferiores. Esta lâmina de vidro especial foi previamente flambada com álcool e, sobre ela, se colocou uma camada de meio completo, retirada da placa de Petri.

3.5.1 MICROMANIPULAÇÃO

Os esporos que sofreram meiose permanecem ainda juntos dentro do asco cuja parede foi enzimaticamente digerida, oferecendo uma dificuldade, pois se torna complicado retirá-los com a agulha de vidro do micromanipulador. Ao microscópio, percebe-se uma abertura pela qual saem os esporos. A técnica de micromanipulação consistiu em : 1) achar ascos portadores dos quatro (4) esporos e, com o auxílio da agulha de vidro acoplada ao microscópio, trazer um asco de cada vez para longe da estria, separando-o do acúmulo de células e ascos misturados; 2) já separado, delicadamente, bateu-se a agulha com o asco na ponta contra o agar e, movendo-se simultaneamente a agulha na direção horizontal, colocou-se em pontos equidistantes os quatro (4) esporos alinhados. Este procedimento foi repetido várias vezes até que toda a superfície do agar estivesse ocupada pelos esporos já isolados. Esta lâmina foi, então, incubada por 24 a 48 h dentro de uma placa de Petri, até que cada colônia, constituindo uma linhagem diferente fosse visível. Cada colônia, uma a uma, foi, então, repicada para placas de Petri contendo meio completo, cuidando-se para identificar as linhagens que foram oriundas de um único asco.

3.6 TESTES QUANTITATIVOS

3.6.1 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCAR

O teor de carboidratos totais presente nas frações da levedura foi medido utilizando-se o teste químico de antrona (Disbe, 1962). Em tubos de ensaio, previamente lavados e etiquetados, adicionou-se, a cada 0,5ml das amostras, 1ml da solução reagente de antrona (0,2% de antrona em ácido sulfúrico concentrado P.A, p/v), em banho de gelo. Três repetições foram feitas de cada amostra e o controle feito com água destilada. Após agitação vigorosa de cada tubo, estes foram tampados, colocando-se uma bolinha de vidro na ponta e cobrindo-se com papel laminado. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria fervente por 16 min. Terminado o tempo de aquecimento, os tubos foram retirados do banho-maria, resfriados naturalmente e levados ao espectrofotômetro (Pye Unicam SP8-400 UV/Vis), onde as respectivas absorbâncias foram medidas em comprimento de onda de 625nm.

Uma curva padrão de diferentes concentrações de glicose foi utilizada para a determinação da concentração de carboidratos, em cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de glicose por ml (Eq. μg glicose/ml) variando de 25 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em função de suas respectivas absorbâncias a 625nm.

3.6.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

O conteúdo total de proteínas das frações foi determinado pelo teste de Lowry (Lowry et alii, 1951). Em tubos de ensaio, previamente lavados e etiquetados, 0,2ml de cada amostra foi adicionada a 1ml de uma solução de carbonato de sódio 0,1N e sulfato de cobre 0,1% em tartarato de sódio potássio 1%. A solução foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 min. Após esta etapa, foi adicionado 0,1ml de reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:1 v/v). A adição deste reagente foi feita com o tubo em agitação constante. Em seguida, deixou-se em incubação por 60 min. A reação foi medida em espectrofotômetro (Pye Unicam SP8-400 UV/Vis) a 500nm. Como padrão, foram utilizadas soluções de soro albumina bovina (SAB). O teor de proteínas presente em cada amostra foi expresso com Eq. em μg de SAB/ml.

3.7 PLANTA

A variedade de soja (*Glycine max* (L.) (Merril) utilizada nos ensaios biológicos foi a IAC-8. Esta variedade foi escolhida por ser, como já verificara Guzzo (1989), a mais adequada quanto à capacidade de sintetizar a fitoalexina gliceolina e quanto à uniformidade de resposta em presença de um elicitador biológico.

As sementes de soja IAC-8 foram gentilmente cedidas pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e semeadas em bandejas de plástico (40 X 50 X 8,5cm) contendo areia peneirada e esterilizada (30min, 121°C). As bandejas, contendo as sementes, foram mantidas em câmaras a uma temperatura de 25°C,

sob umidade relativa de 65% e a um fotoperíodo de 12 h, sob iluminação fluorescente de $2,65 \text{ Wm}^{-2}$ (=1800 lux). Após o crescimento das plântulas até o estágio de duas (2) folhas, aproximadamente oito (8) a dez (10) dias, as bandejas foram retiradas das câmaras e os cotilédones utilizados nos testes.

3.7.1 BIOENSAIO EM COTILÉDONE DE SOJA

O teste biológico empregado para se comprovar a capacidade de síntese da fitoalexina gliceolina na soja, induzida pela levedura *S. cerevisiae*, foi desenvolvido por Ayers et alii (1976) e modificado por Ziegler & Pontzen (1982). No Brasil, o teste foi introduzido no Instituto Biológico de São Paulo por Guzzo (1989).

Os cotilédones de soja a serem empregados neste teste foram previamente selecionados, pois não podem apresentar qualquer tipo de lesão, mancha ou imperfeições. Assim, selecionou-se as sementes antes de serem utilizadas, eliminando-se as portadoras de pequenas cicatrizes ou lesões feitas por ácaros. Tendo as plântulas atingido o estágio de duas (2) folhas, (oito a dez dias), os cotilédones foram delicadamente destacados e lavados, por três (3) vezes, em água destilada esterilizada e enxutos com papel absorvente fino. Com uma lâmina de aço extremamente afiada e esterilizada, cada cotilédone sofreu um corte de cerca de 1mm de espessura e 6mm de diâmetro na sua superfície inferior. Um lote de dez (10) cotilédones foi, então, colocado em placa de Petri sobre a superfície de cinco (5) discos de papel filtro (Fitec-Ind.Com. Filtros Ltda. S.P) previamente umedecidos com água destilada, de modo a deixar os cotilédones boiando sobre a água. Utilizando-se uma micropipeta

automática, aplicou-se aliquotas de 75 μ l da amostra de levedura a ser testada sobre cada um dos cotilédones. Um controle foi feito com a utilização da água destilada esterilizada no lugar da amostra. Três placas contendo dez (10) cotilédones foram preparadas para o teste de cada amostra e cada experimento repetido três (3) vezes.

Terminada a aplicação das amostras, as placas foram tampadas, cobertas com um pano preto, e incubadas por 20 h a 26°C, no escuro. Após o tempo de incubação, os cotilédones foram tranferidos para um Erlenmeyer contendo 20ml de água destilada e deixados sob agitação, durante uma hora, para extrair toda a gliceolina formada. Antes de se proceder à leitura no espectrofotômetro a 285nm, o material foi submetido a um processo de filtração em papel filtro (Fitec-Ind.Com. Filtros Ltda. S.P). Os bioensaios foram executados em câmara de fluxo laminar previamente desinfetada e todo o material utilizado foi esterilizado por autoclavagem (30min, 121°C).

O teste biológico com cotilédone de soja mostrou ser extremamente sensível a variações. Somente com a repetição sistemática dos testes e com a prática ao longo do tempo é que se conseguiu a padronização do experimento. Os cuidados necessários ao êxito deste teste começam na seleção das sementes, como já mencionado. Também o seu tamanho deve ser padronizado. A semente deve ser enterrada na areia a uma profundidade aproximada de 2cm. A profundidade correta é fundamental para o crescimento das plantas no período de oito (8) a dez (10) dias. A temperatura é o principal fator limitante do crescimento. Temperaturas abaixo do valor ótimo retardam significativamente o crescimento das plantas, ao passo que temperaturas muito acima de 25°C prejudicam a avaliação dos resultados devido ao estresse causado nas plantas. A quantidade de água deve ser adequada de tal forma que as sementes não fiquem em ambiente nem muito encharcado nem seco demais. Portanto, deve-se proceder à rega diariamente, de preferência no mesmo horário.

A escolha dos cotilédones a serem utilizados é um cuidado que não deve ser esquecido, pois muitos cotilédones não apresentam a configuração física ideal para desempenharem o papel de suporte das amostras. Por isto, cotilédones muito pequenos ou curvos não devem ser utilizados, porque, ou não comportarão a quantidade de líquido ou a água depositada na superfície da placa de Petri, onde os cotilédones estarão boiando, poderá invadi-los. Para se evitar tais imprevistos, deve-se aumentar a quantidade de cotilédones por placa (treze a quinze em vez de dez). As plantas cujos cotilédones não abriram completamente não devem ser utilizadas, pois aqueles apresentam-se curvos e robustos.

O corte feito na parte inferior do cotilédone deve possuir as seguintes características: ser em forma de uma gota, ou seja, acompanhar o formato do cotilédone; não chegar até as bordas, pois isto fará com que o líquido escorra facilmente; não ser profundo, para não afetar muito os tecidos do vegetal.

Os discos de papel de filtro colocados nas placas para o período de incubação precisam ser recortados do tamanho exato das placas, para que não fiquem com rugas e saliências.

A quantidade de água colocada nas placas deve ser controlada de tal forma que não deixe os cotilédones secarem e não ultrapassem o limite das bordas dos mesmos. Por último, a temperatura durante o tempo de incubação deve ser rigorosamente mantida a 26°C.

4- RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DE LINHAGENS

Das linhagens procedentes da UNICAMP e do Instituto Zimotécnico, apenas a linhagem ATCC-26698 se mostrou regular nos testes para auxotrofia, nunca tendo sido verificada a mínima dúvida quanto ao seu crescimento tanto em meio sintético (mínimo) como em meio completo.

A resposta, sempre uniforme e precisa, demonstrada nos testes preliminares pela ATCC-26698, permitiu que se constatasse com segurança qualquer alteração entre as outras linhagens que estavam sendo testadas. Esta característica da linhagem ATCC- 26698 não foi encontrada em nenhuma outra, ficando claro, portanto, o problema do crescimento residual, característico das outras linhagens, em placas de Petri com meio sólido.

No início da pesquisa o desconhecimento do comportamento das linhagens levou a prolongadas manipulações em laboratório, não sendo possível estabelecer, com antecedência, se a linhagem apresentava algum marcador genético, pois os laboratórios de onde procediam não dispunham de tal informação. Com o decorrer do experimento, o encontro de linhagens que absolutamente não possuíam um comportamento definido em resposta aos testes aplicados, mostrou que o caminho a seguir era o de procurar linhagens já conhecidas sob o ponto de vista genético e evitar, assim, maior perda de tempo. Em consequência, a linhagem ATCC-26698 constituiu-se em exceção, vindo a ser utilizada como controle e todas as outras linhagens da UNICAMP e do Instituto Zimotécnico foram descartadas. As linhagens provenientes da USP passaram, gradativamente, a substituí-las.

As características que levaram preferencialmente à seleção de linhagens, na fase preliminar da pesquisa, foram, principalmente, a resposta precisa quando colocadas para crescer em meios com fontes nutritivas diferentes, para se constatar se a linhagem era ou não mutante e o grupo de compatibilidade determinado. Posteriormente, após estabelecida a metodologia e confirmadas as linhagens que deveriam ser utilizadas, o teor de polissacarídeos constituiu-se na única característica desejável para a continuação do trabalho.

4.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

4.2.1 LAVADO

4.2.1.1 VARIAÇÃO DO TEOR DE GLICOSE NO MEIO DE CULTURA

A tabela I mostra o peso fresco das linhagens ATCC- 26698 e GRF-18 de *S. cerevisiae* crescidas em decrescentes concentrações de glicose. Nota-se que a concentração inicial de glicose do meio é um fator limitante do crescimento, principalmente para a linhagem mutante. A linhagem controle (ATCC-26698) teve o seu crescimento reduzido, mas, mesmo assim, conseguiu crescer quando a concentração de glicose inicial do meio foi de 0,0% .

TABELA I

Peso fresco¹ das linhagens ATCC-26698 e GRF-18 de *S.cerevisiae* crescidas em diferentes concentrações de glicose.

Linhagens	Concentração de glicose ² :						
	2%	1%	0,2%	0,1%	0,02%	0,01	0,0%
ATCC-26698	1,15 ³	1,15	0,78	0,72	0,57	0,49	0,37
GRF-18	1,05	0,67	0,30	0,17	-	-	-

1- Peso fresco em gramas das duas (2) linhagens consideradas.

2- Concentração de glicose do meio de crescimento (YEPD) tomada em porcentagem do total.

3- Média de duas (2) repetições.

4.2.1.2 VARIAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS NO MEIO CULTURA PARA CRESCIMENTO DAS LINHAGENS ATCC-26698 E GRF-18 DE *S. cerevisiae*.

O teor inicial de carboidratos, tanto do meio de cultura livre de células quanto do "lavado", foi quantificado (conforme item 3.6.1) nas respectivas variações da concentração de glicose, como pode ser visto na tabela II.

Quanto ao "lavado" pode-se constatar que a presença de açúcares está relacionada com a concentração inicial do meio de cultura. Esta observação pode ser comprovada pelos dados da tabela II que mostram a dosagem ao se fazer apenas uma lavagem das células. Ao se proceder à 2ª lavagem, o teor de carboidratos teve uma queda acentuada, o que pode ser confirmado pelos dados da tabela VI.

TABELA II

Quantificação do teor¹ de carboidratos totais solúveis do meio de cultura e do "lavado," após crescimento, das linhagens ATCC- 26698 E GRF-18 de *S. cerevisiae*, em presença de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura.

Teor de carboidratos totais solúveis para as linhagens de <i>S. cerevisiae</i> :					
GLICOSE		ATCC-26698		GRF-18	
%	Meio ²	" lavado" ³	Meio	"lavado"	
2,0	1560	280	1710	200	
1,0	950	210	1515	180	
0,2	1010	650	1220	120	
0,1	320	73	1170	90	
0,02	605	73	1420		
0,01	660	73	1305		
0.0	700	95	1080		

1- Teor total de carboidratos solúveis, medido pelo método de antrona, em Eq.µg de glicose/ml.

2- Fração representada pelo meio de cultura livre de células onde se desenvolveram as linhagens de *S. cerevisiae*.

3- Fração representada pela lavagem das células de *S. cerevisiae* separadas do meio de cultura.

Média de duas repetições.

4.2.1.3 VARIAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS SOLÚVEIS DA FRAÇÃO "LAVADO" DA LINHAGEM ATCC-26698 DE *S. cerevisiae*, APÓS DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.

Os dados anteriores (item 4.2.1.2) são corroborados pelos resultados dos testes feitos com a fração "lavado" da linhagem ATCC-26698 de *S. cerevisiae* para se determinar se a fração extracelular derivada da lavagem das células apresentava ou não enriquecimento posterior de polissacarídeos ao meio de cultura. Observa-se que independentemente do tempo deixado em agitação, o teor de carboidratos totais solúveis não apresentou nenhum aumento significativo. Ao contrário, diminuiu consideravelmente do intervalo de tempo "zero" a quarenta e oito (48) horas. Tais constatações determinaram que não haveria vantagem em se aproveitar a fração "lavado," por ela não proporcionar o enriquecimento do meio com açúcares extracelulares além daqueles pertencentes ao meio de cultura original. A quantidade de carboidratos da fração "lavado" não cresceu proporcionalmente ao tempo de agitação, isto é: o teor de açúcares do tempo "zero" e após quarenta e oito (48) horas não teve um aumento significativo como mostrado pelo teste "t" ao nível de 5% (tabela III).

TABELA III

Variação do teor¹ de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" da linhagem ATCC-26698 de culturas de *S. cerevisiae*, crescidas em diferentes intervalos de tempos.

Teor de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" da linhagem ATCC-26698			
TEMPO (horas)	média		desvio padrão
0	29,67 ²	±	3,21
1/2	21,00	±	0,00
2	16,33*	±	6,11
6	16,33*	±	1,26
10	18,00*	±	4,58
24	16,67*	±	3,06
48	12,25*	±	4,60

1- Teor de carboidratos totais solúveis medido pelo método de antrona, em Eq. µg de glicose /ml.

2-Médias seguidas de asterisco são significativamente diferentes da média do tempo "zero" ao nível de 5% (P<0,05) (teste t).

Média de três repetições.

4.2.2 LISADO

4.2.2.1 DEFINIÇÃO DO MÉTODO DE LISE CELULAR

Observações ao microscópio óptico constataram a presença de 100% de células completamente intactas, resultantes da tentativa de lise tanto pelo desintegrador celular Hannover quanto pelo ultra-som. A desintegração mecânica, em presença de nitrogênio líquido acrescido de carborundum, foi o único procedimento que apresentou, ao microscópio, células completamente lisadas. Por conseguinte, demonstrou ser o método mais eficiente, apesar de mais trabalhoso e demorado.

4.2.2.2. COMPARAÇÃO DA OSCILAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS EM VÁRIAS REPETIÇÕES

O investimento de tempo e trabalho dispensados à fração "lavado" só seria compensador se a taxa de carboidratos totais solúveis fosse aumentando significativamente com o tempo de agitação. Como isto não ocorreu (tabela III), a fração "lavado" foi descartada dos testes posteriores e iniciou-se a seleção de linhagens, utilizando-se apenas o lisado celular. O método de lise celular selecionado foi submetido a repetições com o objetivo de se constatar a sua confiabilidade, uma vez que o método em si, por depender da força mecânica do experimentador, poderia resultar em dados não reproduzíveis. A tabela IV mostra o peso em gramas das repetições feitas com as linhagens ATCC-26698, GRF-18 e uma linhagem comercial de fermento biológico Fleischmann (FL). Pode-se observar que o crescimento da linhagem comercial FL não chegou a 1,0 gr. A diferença entre as médias foi significativa ao nível de 5% pelo teste "t". Observa-se, também, que o crescimento foi extremamente regular nas quatro (4) repetições.

TABELA IV

Peso fresco em gramas das linhagens ATCC-26698 , GRF-18 e FL de *S. cerevisiae* crescidas em meio completo líquido (YEED), antes de lise celular .

Nº do Experimento	Peso fresco em gramas das linhagens:		
	ATCC	GRF-18	FL
1	1,26	1,16	0,87
2	1,26	1,04	0,90
3	1,16	1,09	0,89
4	1,16	1,06	0,91
Média	1,21* \pm 0,06	1,09* \pm 0,05	0,89 \pm 0,02

1- Médias seguidas de asterisco são significativamente diferentes da linhagem FL ao nível de 5% ($P < 0,05$) (teste-Tukey).

A linhagem comercial apresentou uma característica não comumente encontrada em linhagens de laboratório: a floculação. É uma linhagem possivelmente poliplóide, como geralmente ocorre com linhagens comerciais, cujas células são maiores do que as células haplóides, o que pode ser observado ao microscópio óptico. Com relação ao crescimento, constatou-se variação na velocidade de crescimento entre as três linhagens, sendo a comercial a linhagem que menos cresceu, em comparação com as outras, nas mesmas condições de laboratório. Pela análise de variância e teste de Tukey, houve diferença significativa também entre as linhagens ATCC-26698 e GRF-18. O coeficiente de variação foi de 4,32 .

A tabela V mostra os resultados da taxa de polissacarídeos do lisado e a tabela VI se refere ao "lavado". Quatro repetições foram feitas com três linhagens diferentes: a linhagem ATCC-26698, a GRF-18 e uma linhagem comercial de fermento biológico Fleischmann (FL).

Verifica-se que houve uma variação estatisticamente significativa no teor de carboidratos da fração lisada (tabela V) entre as linhagens, demonstrada pelo teste de Tukey. A linhagem ATCC-26698 apresentou um teor de carboidratos superior aos das outras duas linhagens. O coeficiente de variação encontrado foi de 18,2.

Quanto ao "lavado"(tabela VI) a linhagem GRF-18 apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação à linhagem FL, como pode ser constatado pelo teste de Tukey. O coeficiente de variação encontrado foi de 25,335.

TABELA V

Teor¹ de carboidratos totais solúveis da fração lisada das linhagens ATCC-26698, GRF-18 e FL de culturas de *S. cerevisiae* crescidas em meio completo líquido (YEPD), em quatro repetições.

Teor de carboidratos totais solúveis da fração lisada das linhagens:

Nº do Experimento	ATCC-26698	GRF-18	FL
1	113,0	37,0	20,0
2	98,0	17,0	14,0
3	88,0	19,0	22,0
4	93,0	27,0	13,5
Média	98*2 ± 10,80	25 ± 9,09	17,38 ± 4,27

1- Teor de carboidratos totais solúveis medido pelo método de antrona em Eq. µg de glicose /ml.

2-Médias seguidas de asterisco são significativamente diferentes da linhagem FL ao nível de 5% (P<0,05) (teste-Tukey).

TABELA VI

Teor¹ de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" das linhagens ATCC-26698, GRF-18 e FL de culturas de *S. cerevisiae* crescidas em meio completo líquido, em quatro repetições.

Nº do Experimento	Teor de carboidratos totais solúveis da fração "lavado" das linhagens:		
	ATCC-26698	GRF-18	FL
1	18,5	22,0	11,0
2	20,0	29,0	8,0
3	27,0	20,5	14,0
4	14,0	19,0	11,0
Média	19,88² ± 5,39	22,63* ± 4,42	11,0 ± 2,45

1- Teor de carboidratos totais solúveis medido pelo método de antrona em Eq. µg de glicose/ml.

2-Médias seguidas de asterisco são significativamente diferentes da linhagem FL ao nível de 5% (P<0,05) (teste- Tukey).

4.2.2.3. SELEÇÃO DE LINHAGENS E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS APÓS LISE CELULAR.

Diferentes linhagens foram submetidas à criotrituração e ao teste químico de antrona. O teor de carboidratos encontrado é mostrado na tabela VII.

Os dados da tabela VII mostram que duas linhagens sobressaíram na quantidade de carboidratos presente no lisado: a ATCC-26698 e a 665-1A. Nota-se, ainda, que a maioria das linhagens apresentou um teor médio de carboidratos estatisticamente não significativo, que variou de 13 a 27 Eq. em μg de glicose/ml.

As duas linhagens, que sobressaíram, ultrapassaram esta faixa média, apresentando uma diferença altamente significativa em relação às demais e foram selecionadas para o cruzamento.

TABELA VII

Teor¹ de carboidratos totais solúveis da fração lisada de diferentes linhagens de *S.cerevisiae* crescidas em meio completo líquido (YEPD).

Linhagens	média	±	desvio padrão
ATCC 26698	101,33*2	±	10,40
DC-6	16,33	±	3,21
AH-22	2,33	±	7,09
C1	24,00	±	5,29
1784	13,00	±	5,56
1783	17,16	±	9,75
1788	19,66	±	6,42
FL	18,66	±	5,88
GRF-18	27,66 *	±	9,01
RC.631	25,66	±	7,09
D.665.1A	79,00*	±	7,87
TD-20	15,00	±	1,00

1- Teor de carboidratos totais solúveis medido pelo método de antrona em Eq.µg de glicose/ml.

2- Médias seguidas de asterisco são significativamente diferentes ao nível de 5% (P<0.05)(teste-Tukey). Média de três repetições.

4.3 CRUZAMENTOS

As linhagens cruzadas foram escolhidas de acordo com dois critérios: 1) maior quantidade de carboidratos totais solúveis presente no lisado e 2) grupo de compatibilidade determinado.

A média dos valores das repetições foi usada para comparação das linhagens entre si.

Como não seria possível o cruzamento de todas as linhagens entre si, pois demandaria mais tempo do que o disponível, optou-se pelo cruzamento entre as duas mais representativas do grupo. Tentativas foram feitas para se cruzar a linhagem ATCC-26698 com a GRF-18 mat α e a D.665.1A mat a. Os resultados dos cruzamentos com linhagem ATCC-26698 não foram positivos.

O cruzamento das linhagens GRF-18 com a D.665.1A, resultou em setenta e seis (76) novas linhagens haplóides, conseguidas por micromanipulação. O resultado é mostrado na tabela VIII e permitiu separar as linhagens de acordo com o asco do qual foram oriundas. Assim, as colônias provenientes de um mesmo asco foram arbitrariamente numeradas, sendo as colônias de números 1,2,3,4, pertencentes a um único asco; as colônias de números 5,6,7,8, a outro asco, e assim por diante. Cada colônia representa, pois, uma linhagem diferente, haplóide e produto de meiose.

TABELA VIII

Tétrades haplóides procedentes de ascos do cruzamento das linhagens GRF-18 e 665-1A de *S. cerevisiae* separadas por micromanipulação.

Asco ¹	Tétrades	Asco	Tétrades
I	1, 2, 3, 4 ²	XI	41,42,43,44
II	5, 6, 7, 8	XII	45,46,47,48
III	9,10,11,12	XIII	49,50,51,52
IV	13,14,15,16	XIV	53,54,55,56
V	17,18,19,20	XV	57,58,59,60
VI	21,22,23,24	XVI	61,62,63,64
VII	25,26,27,28	XVII	65,66,67,68
VIII	29,30,31,32	XVIII	69,70,71,72
IX	33,34,35,36	XIV	73,74,75,76
X	37,38,39,40		

1- Ascós numerados aleatoriamente.

2- Colônias oriundas do mesmo asco.

4.3.1 QUANTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE LINHAGENS RESULTANTES DE CRUZAMENTO PARA USO EM BIOENSAIOS.

Foram analisadas as amostras provenientes de seis (6) ascos diferentes do cruzamento das linhagens D.665-1A X GRF-18. Os testes químicos feitos com estas amostras mostraram diferenças quantitativas no teor de polissacarídeos tanto nas amostras provenientes de um mesmo asco como entre amostras de ascos diferentes. A análise dos dados permitiu a identificação de quatorze (14) linhagens que apresentaram teores maiores do que o pai de maior valor e apenas um (1) com teores inferiores ao pai de menor valor. Outras nove (9) apresentaram teores médios que oscilaram entre 27 e 80 Eq. em μg de glicose/ml. Pode-se constatar, portanto, que houve predominância de linhagens com teores maiores do que ambos os pais. Através da micromanipulação ficou garantida a procedência e a pureza do material a ser trabalhado.

A Tabela IX expõe o teor de carboidratos totais solúveis de vinte e quatro (24) linhagens haplóides, oriundas de cruzamento em laboratório. Os dados representam a réplica de maior concentração, cuja amplitude de variação está entre 13 e 145 Eq. em μg de glicose/ml. Também aqui ficou claro a existência de grande variabilidade genética conferida pelo método de lise celular utilizado .

TABELA IX

Teor¹ de carboidratos totais solúveis da fração lisada de 24 tétades derivadas de ascos resultantes do cruzamento das linhagens GRF-18 X 665-1A de *S. cerevisiae*.

Teor de carboidratos totais solúveis da fração lisada de tétades derivadas de seis ascos:					
Tétade		glicose em	Tétade		glicose em
Nº		Eq. µg/ml	Nº		Eq. µg/ml
	1	53 ²		13	141
Asco	2	33	Asco	14	100
I	3	21	IV	15	109
	4	14		16	88
	5	27		17	50
Asco	6	100	Asco	18	77
II	7	101	V	19	84
	8	102		20	94
	9	88		21	145
Asco	10	57	Asco	22	95
III	11	44	VI	23	80
	12	52		24	122

1- Teor de carboidratos totais solúveis medido pelo método de antrona em Eq. µg de glicose/ml.

2- Réplica de maior concentração de carboidratos entre três repetições.

4.3.2 ATIVIDADE ELICTORA MEDIDA ATRAVÉS DE BIOENSAIO

Amostras de frações lisadas de tétrades oriundas do cruzamento das linhagens GRF-18 X 665-1A com teores diferenciados de carboidratos foram testadas em bioensaio a fim de se verificar sua capacidade de elicitar a gliceolina na soja. Além das linhagens selecionadas do cruzamento em laboratório, foram utilizados dois extratos de células lisadas da levedura *S.cerevisiae* com concentração de 414 Eq. em μg de manose/ml (Bacto yeast extract) da Difco e com concentração de 2413 Eq. em μg de manose/ml da London analytical & bacteriological media Ltd. Estas frações foram denominadas de LevI e LevII, respectivamente.

A tabela X mostra os resultados dos bioensaios medidos através do valor $A_{285\text{nm}}$, e a tabela XI mostra o teor de carboidratos e proteínas de cada amostra assim como a porcentagem em relação ao total. As amostras LevI e LevII, possuidoras de teores bem acima dos apresentados pelas linhagens testadas, mostraram alta capacidade de elicitar a fitoalexina gliceolina, como pode ser visto pelos dados da tabela X.

TABELA X

Atividade elicitora de frações lisadas de diferentes linhagens com diferentes teores de açúcares medida através de bioensaio em cotilédones de soja.

Linhagens	Atividade elicitora ¹ (A _{285nm}) de frações lisadas de linhagens com teores diferenciados de açúcares:	
	Controle ²	Tratamento ³
4	0,264 ± 0,058	0,343 ⁴ ± 0,063
8	0,220 ± 0,044	0,345* ± 0,052
9	0,220 ± 0,044	0,574* ± 0,087
20	0,220 ± 0,044	0,537* ± 0,084
21	0,264 ± 0,058	0,322* ± 0,016
665-1A	0,257 ± 0,063	0,276* ± 0,041
Zigoto	0,276 ± 0,077	0,318* ± 0,058
LevI	0,255 ± 0,107	0,684* ± 0,136
LevII	0,255 ± 0,107	1,397* ± 0,321

1- O valor A_{285nm} é considerado como atividade elicitora (Ayers et alii, 1976).

2- Controle: cotilédones tratados com água destilada esterilizada.

3- Tratamento: cotilédones tratados com a fração lisada possuindo diferentes concentrações de glicose/ml.

4- Médias seguidas por um asterisco são significativamente diferentes do controle ao nível de 5%(P<0,05)(teste- t). Média de três experimentos com três réplicas ± desvio padrão.

TABELA XI

Teor de carboidratos¹ e de proteínas² totais da fração lisada das linhagens de *S.cerevisiae* utilizadas no bioensaio em cotilédones de soja.

Linhagens	Carboidratos		Proteínas	
	glicose em Eq. µg/ml	%fração ³	SAB em Eq. µg/ml	%fração
4	14	7,6	170	92,4
8	102	7,4	1260	92,95
9	88	46,8	100	53,19
20	94	56,28	73	43,72
21	145	81,46	33	18,54
665-1A	79	28,42	199	71,58
zigoto	91	48,66	96	51,34
levI	414 ⁴			
levII	2413			

1- Teor de carboidratos totais solúveis medido pelo método de antrona em Eq. µg de glicose/ml.

2- Teor de proteínas totais medido pelo método de Lowry em Eq. µg de SAB/ml.

3- Porcentagem de carboidratos e proteínas das frações lisadas tomada em relação ao total.

4- Teor de carboidratos totais solúveis presente na fração lisada comercial medido pelo método de antrona em Eq. µg de manose/ml.

4.3.3 ATIVIDADE ELICITORA RELATIVADA DAS FRAÇÕES

A atividade elicitora relativa (AER) das frações é dada através da seguinte fórmula:

$$Y = \frac{(\mu\text{g de carboidratos / ml}) \times 0,5}{AE} \quad \text{onde:}$$

Y = concentração da fração requerida para fornecer uma atividade elicitora relativa igual a 0,500;

$\mu\text{g de carboidratos / ml}$ = concentração de carboidratos na fração

AE = atividade elicitora da fração determinada por bioensaio em cotilédone de soja.

Os valores obtidos (Y) são inversamente proporcionais às atividades elicitoras relativas das frações.

0,5 = é um valor arbitrário de atividade elicitora, escolhido para efeito de comparação segundo Hahn & Albersheim (1978). A tabela XII mostra os valores das atividades relativas das frações lisadas testadas em bioensaio.

TABELA XII

Atividade elicitora relativa das frações lisadas de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* com diferentes teores de açúcares medida através de bioensaio em cotilédones de soja.

Linhagens	Carboidratos ¹	AER ²	1/y
4	14	20,40	0,049
8	102	147,82	0,007
9	88	76,65	0,013
20	94	87,52	0,011
21	145	22,51	0,044
665-1A	79	88,76	0,011
zigoto	91	143,08	0,007

1- Teor de carboidratos totais solúveis das frações lisadas medido pelo método de antrona em Eq. µg de glicose/ml.

2- Atividade elicitora relativa obtida pela média dos valores de A_{285nm} em três experimentos com três réplicas.

5- DISCUSSÃO

5-1 SELEÇÃO DE LINHAGENS E OBTENÇÃO DE FRAÇÕES.

Dentre as linhagens procedentes da UNICAMP, apenas a ATCC-26698 foi aproveitada neste trabalho por ser estável em meio de cultura, quer seja mínimo, quer seja completo. Esta linhagem apresentou um crescimento extremamente regular nas diversas repetições realizadas. Apesar de não se poder afirmar com segurança, uma vez que não foram obtidas maiores informações no laboratório de procedência, supõe-se que a razão deste comportamento pode ser encontrada no fato desta linhagem poder ser tanto diplóide como poliplóide. A única informação obtida foi a de esta linhagem que é boa produtora de álcool. Estudos visando a este tipo de informação estavam além dos objetivos deste trabalho.

As linhagens procedentes do Instituto Zimotécnico não foram aproveitadas por estarem contaminadas, o que naturalmente dificultou a interpretação dos testes para auxotrofia e explica o aparecimento do crescimento residual persistente característico destas linhagens. Tais observações ficaram ainda mais evidentes quando se comparou o desempenho das linhagens provenientes da USP com as do Instituto Zimotécnico. A

diferença de comportamento entre elas mostrou que se estava diante de um material extremamente mal conservado e que não poderia ser utilizado no trabalho. A importância da origem e da pureza do material ficou ressaltada nesta pesquisa, proporcionando a eliminação de muitos testes, economizando tempo e custo e dando maior segurança na interpretação dos resultados. A comparação dos dados obtidos neste trabalho com os de outros autores é prejudicada pela escassez de estudos semelhantes com a levedura *S. cerevisiae*. A razão desta lacuna na literatura é mais um motivo para que pesquisadores busquem preenchê-la. Encontram-se muitos trabalhos relacionados à composição química de estruturas celulares, como a parede celular (e.g. Phaff, 1963; Bacon et alii, 1969; McMurrugh & Rose, 1967), mas a ligação entre esta e a elicitação de fitoalexinas em plantas é praticamente inexistente para linhagens de *S. cerevisiae*, principalmente as não-comerciais. O presente estudo é, portanto, pioneiro neste aspecto e os resultados obtidos mostram satisfatoriamente o alcance dos objetivos propostos porque:

a) a comparação do teor de polissacarídeos foi executada em diferentes linhagens, aleatoriamente conseguidas;

b) frações completamente distintas da levedura foram utilizadas para a comparação do teor de polissacarídeos, ou seja, uma fração extracelular denominada "lavado" e uma fração derivada do interior da célula;

c) o descarte da fração "lavado" é um resultado positivo pois, poderá contribuir com pesquisas futuras;

d) as linhagens com maior teor de polissacarídeos foram selecionadas e os híbridos, obtidos.

e) através de bioensaios foi estimada a eficiência dos híbridos pela produção de gliceolina em cotilédones de soja.

Os testes preliminares feitos com a fração "lavado," visando ao conhecimento do comportamento de diferentes linhagens nas condições desejadas, foram executados com duas (2) linhagens que, nutricionalmente, eram bem diferentes: a ATCC-26698 e a mutante GRF-18.

A análise dos dados da tabela I mostra que a concentração de glicose mínima necessária para o crescimento de uma linhagem é de 2% e, assim sendo, esta taxa foi mantida nos testes seguintes uma vez que, com menor concentração, o crescimento da linhagem mutante ficou comprometido. Comparando-se o peso das duas linhagens, verifica-se que a ATCC-26698 obteve o mesmo rendimento quando a dosagem de glicose foi reduzida de 2% para 1%, o que não aconteceu com a GRF-18. Nas dosagens subsequentes, a ATCC-26698 manteve o seu crescimento, decaindo lentamente e conseguindo manter-se mesmo em um meio totalmente desfavorável.

Com relação à concentração de glicose no meio de cultura, a literatura menciona a taxa de 2% usada correntemente por pesquisadores da área, fazendo parte da composição básica do meio para crescimento de levedura (Fink, 1970). Porém, Polakis & Bartley (1966) citam 0,9%. Os resultados aqui apresentados comprovam ambos os dados da literatura, uma vez que diferenças consideráveis foram observadas na taxa de crescimento das linhagens e devem ser levadas em consideração. O crescimento da linhagem ATCC-26698 foi praticamente o mesmo com a concentração de 2% e de 1% de glicose na composição do meio de cultura (valor bem próximo ao de Polakis & Bartley, 1966) enquanto que, para a linhagem mutante, o mínimo necessário foi de 2% (tabela I). A linhagem mutante não se

desenvolveu quando a concentração de glicose do meio foi de 0,0% e a ATCC-26698 teve um desempenho até maior do que a GRF-18, quando esta cresceu em um meio com 0,2% de glicose. Possivelmente, isto se deveu à utilização pela ATCC-26698 de açúcares liberados por outros componentes do meio de cultura. A linhagem mutante, não sendo capaz de utilizar estes resíduos, teve seu crescimento paralisado. Segundo Barnett (1976), cada linhagem de levedura tem uma taxa de crescimento própria que se modifica se qualquer uma das condições ideais for mudada (temperatura, requerimentos nutricionais, etc). Concluiu-se, pois, que a concentração de glicose deve ser ajustada de acordo com as necessidades de cada linhagem.

Os testes com a fração "lavado" visaram, também, à obtenção de informações sobre a variação do teor de carboidratos totais solúveis no meio de cultura. Comparando-se o teor de carboidratos totais solúveis encontrado no meio de cultura da linhagem controle (após crescimento) com o encontrado na linhagem mutante, notamos que no primeiro caso a quantidade de açúcares decresceu concomitantemente com a concentração de glicose do meio. Isto não ocorreu no segundo caso, sugerindo a utilização dos açúcares liberados pelos outros componentes do meio de cultura, após sua degradação, pela linhagem ATCC-26698 e não pela GRF-18.

O teor inicial de carboidratos totais solúveis presente no meio de cultura e oriundo da degradação de outros componentes do meio de cultura da linhagem mutante permaneceu, praticamente, inalterado nas diferentes variações de glicose testadas, enquanto que o teor da linhagem controle foi reduzido, aproximadamente, pela metade. Os resultados mostrados na tabela II são consistentes com a pressuposição colocada, anteriormente, de que a linhagem ATCC- 26698 utilizou açúcares liberados por outros componentes do meio. Observando-se a dosagem de açúcar do meio de cultura feita com 2% e com 1%, verifica-se

que houve um consumo bem maior de açúcar por esta linhagem do que pela GRF-18, nas mesmas condições de cultivo. Comparando-se os dados da taxa de carboidratos presente no meio de cultura com a presente no "lavado", nota-se que esta decresceu concomitantemente à concentração de açúcar do meio. As evidências sugerem, pois, que o açúcar presente na fração "lavado" é resíduo do meio de cultura e não proveniente do metabolismo celular da levedura. Tal afirmação ficou fortalecida quando se verificou a variação do teor de carboidratos totais da fração "lavado" em diferentes intervalos de tempo. A diferença, estatisticamente significativa (tabela III), entre o teor de carboidratos presente no "lavado" no 1º intervalo de tempo em relação aos seguintes sugere que a levedura *S. cerevisiae* não produz polissacarídeos extracelulares em quantidades detectáveis pelo método utilizado para a fração "lavado".

Quanto ao lisado, vários métodos de lise celular são descritos. Nickerson (1963) cita: 1) quebra mecânica por colisão ou impacto; 2) quebra por ultra-som; 3) exposição à ação enzimática. Em qualquer dos casos, o material celular deve ser separado do meio para as análises subsequentes. O autor salienta que as células da levedura *S. cerevisiae* são muito resistentes para serem quebradas por ultra-som. O tempo gasto para a quebra da levedura é muitas vezes maior do que para células de bactérias ou de outros gêneros de levedura. Os dados aqui obtidos estão de acordo com a observação de Nickerson, pois, mesmo usando-se um aparelho de ultra-som com potência superior ao citado pelo referido autor, as células da levedura não se romperam. Entretanto, ABD-EL-AL & Phaff (1968) conseguiram resultados com eficiência entre 50% e 95% utilizando um aparelho de ultra-som (20 kc /seg), mas não mencionaram o tempo. A quebra mecânica por agitação com cristais de vidro em desintegrador do tipo "Mickle" foi usada por Northcote & Home (1952); McMurrough & Rose (1967) e Power & Challinor (1969), durante uma hora, para quebrar células normais

da levedura. Outros autores utilizaram a quebra mecânica com um homogeneizador tipo "Braun"(Fleet & Manners, 1976). O princípio da quebra mecânica também foi utilizado neste trabalho, mas as seguintes modificações foram introduzidas: 1) a quebra mecânica foi executada pelo experimentador, por trituração e não por agitação em aparelho elétrico; 2) acrescentou-se às células uma quantidade de carborundum (limalhas de ferro) e não cristais de vidro; 3) a trituração foi executada em presença de nitrogênio líquido. O congelamento imediato das células juntamente com o carborundum, somados à força física exercida pelo experimentador, contribuíram para a lise celular. Uma das desvantagens em relação aos demais relaciona-se com a participação direta do pesquisador no processo, o que poderia inviabilizá-lo, aumentando o erro experimental em demasia. Esta desvantagem, porém, é compensada quando se verifica que este método pode ser perfeitamente introduzido em laboratórios desprovidos de aparelhagem mais sofisticada, sendo que o tempo gasto para trituração mecânica é também de 1 h. A análise dos dados apresentados na tabela V e VI permite-nos salientar que: 1) os dados referentes às repetições são perfeitamente reproduzíveis; 2) existe oscilação do teor de açúcar entre as repetições, maior no lisado; 3) há variabilidade quanto ao teor de carboidratos encontrado em cada linhagem; 4) este fenômeno é uma característica própria de cada linhagem; 5) a linhagem comercial FL se mostrou estatisticamente inferior às outras no teor de carboidratos, tanto do "lavado" como do lisado. As repetições executadas com três linhagens diferentes (tabela V) mostram que, apesar da existência de oscilação no teor de açúcar entre as mesmas, a identidade de cada linhagem não foi prejudicada. Os desvios obtidos são perfeitamente aceitáveis. Acrescenta-se a isto uma percentagem de erro inerente a qualquer teste químico de quantificação, o fato de se ter como padrão a média de três repetições para cada amostra e, ainda, o controle do tempo. A variação existente entre os teores de açúcares do lisado entre as linhagens poderia ser atribuída ao peso diferenciado das mesmas. Pela tabela IV verifica-se que o peso das

linhagens ATCC-26698, GRF-18 e FL são estatisticamente diferentes e apresentaram diferenças significativas no teor de açúcares presente no lisado (tabela V). Por esta razão, o desempenho igual na taxa de crescimento foi rigorosamente controlado a fim de não interferir na quantificação de açúcares, tanto do lisado quanto do "lavado,". A quantidade de células submetida à trituração certamente influi no resultado. A diferença, estatisticamente significativa, encontrada entre as linhagens ATCC-26698, GRF-18 e FL pode ser devida também, ao crescimento diferenciado das mesmas apesar da variação ter ocorrido mesmo entre repetições com o mesmo peso.

A lise celular de inúmeras linhagens da levedura *S.cerevisiae* revelou a presença de teores diferenciados, estatisticamente significativos, de carboidratos totais. O aparecimento de linhagens cujo teor de carboidratos excede à média da maioria, é uma constatação de que é possível o encontro de linhagens que apresentem valores ainda maiores do que os encontrados pela oportunidade de aparecimento de combinações genéticas favoráveis. O cruzamento entre as linhagens mais produtoras visou, exatamente, ao aparecimento de tais combinações. O presente estudo proporcionou a primeira evidência direta de que é viável a seleção de linhagens de laboratório altamente variáveis quanto a esta característica possibilitando a utilização de um marcador genético importante na busca de elicitores de fitoalexinas.

5-2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE LINHAGENS COMERCIAIS E DE LABORATÓRIO.

A possibilidade de linhagens não-comerciais de *S.cerevisiae* serem capazes de estimular a produção de fitoalexina em tecidos de plantas foi, também, confirmada neste estudo e faz extensão ao trabalho de Hahn & Albersheim (1978). Os referidos autores isolaram e caracterizaram um elicitor retirado do extrato comercial da levedura *S.cerevisiae*, obtido da Difco Co., Detroit. A utilização de extrato lisado e de linhagens comerciais da levedura tem sido feita, até recentemente, por pesquisadores brasileiros (Guzzo, 1989; Roveratti, 1989) pelo fato de não se ter ainda um programa de melhoramento e seleção onde se possa encontrar linhagens para este fim. Decorre daí que o uso de linhagens comerciais implica na aceitação de características geneticamente manipuladas, interessantes às indústrias. Linhagens de laboratório poderiam ser manipuladas para canalizar características essenciais a um bom elicitor de fitoalexina como, por exemplo, o alto teor de carboidratos ligados em configuração β e que possuam uma estrutura química que propicie o máximo de elicitação. O interesse em induzir fitoalexina pode dispensar uma das características mais importantes na fermentação industrial, a floculação. A habilidade de floculação está incluída entre os critérios de seleção para melhoramento de leveduras produtoras de álcool, e pode ser definida, segundo Johnston & Reader (1983), como "a agregação (reversível) de células dispersas da levedura, em flocos, geralmente no final da fermentação e subsequente separação dos flocos do líquido sobrenadante". Algumas linhagens híbridas para a produção de rum e uísque estão sendo examinadas quanto à floculação e ao significado deste comportamento. A análise do controle genético da floculação representa uma das poucas investigações de uma característica tecnológica importante nas leveduras, assim como a quantificação de carboidratos pode representar para a indução de proteção em plantas.

A floculação é uma propriedade associada à estrutura da parede celular, mais especificamente, às proteínas da parede (Johnston & Reader, 1983) e não aos seus carboidratos. A floculação e o teor de carboidratos são características que, apesar de serem antagônicas em certos aspectos, apresentam, pelo menos, um aspecto em comum. São características quantitativas e, como tal, variam grandemente no grau de intensidade. Apresentam, pois, grande interesse acadêmico, além de tecnológico, porque existem poucos exemplos de análise genética de características quantitativas em microrganismos.

Os resultados apresentados sugerem, assim a inclusão do teor de carboidratos como uma característica de seleção para se chegar à obtenção de um elicitor eficiente e rico especificamente em β -glucanas. O elicitor proveniente da levedura *S. cerevisiae* compartilha muitas características com o elicitor isolado do patógeno *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (Ayers et alii, 1976a, b). A purificação parcial do elicitor mostrou ser ele constituído de glucanas ligadas na configuração β . A importância deste tipo de configuração foi demonstrada por trabalhos subsequentes (Sharp et alii, 1984a, b, c). Cheong et al. (1991) reforçaram a importância da estrutura química da molécula elicitora comparando onze (11) hepto- β -oligoglicosídeos. A configuração responsável pela máxima atividade elicitora era formada por glucanas ligadas na configuração $\beta(1-6)$ com ramificações $\beta(1-3)$. A estrutura química da parede celular de *S. cerevisiae*, demonstrada por Bacon & Farmer (1968), é uma mistura de um componente principal constituído por uma β -glucana (1-3) e um componente secundário, por uma β -glucana (1-6). Manners et al. (1973 b), confirmando a estrutura química da parede celular da levedura, enfatizaram que os resultados analíticos se aplicavam somente a glucanas de um exemplar particular da levedura, que as preparações de diferentes cepas podem diferir na proporção relativa dos dois (2) componentes (85% de β -glucana de alto peso molecular de ligações 1-3 e 15% com alta proporção de ligação 1-6) e que os

componentes individuais podem variar consideravelmente no grau de ramificação e em outros parâmetros estruturais.

A linhagem comercial do fermento biológico tipo Fleishmann, usada no presente experimento, mostrou rendimento inferior ou igual às outras linhagens. Por outro lado, as linhagens comerciais não são haplóides e podem até ser aloploplóides, ou seja, organismos híbridos com genes de espécies diferentes (Fink, 1970). O fato da linhagem ATCC-26698 não ter cruzado com outras linhagens de ambos os grupos de compatibilidade é uma forte indicação de que ela é, no mínimo, diplóide, característica esta que se soma às outras já especificadas anteriormente e que ajuda à montagem de um perfil fenotípico desta linhagem. Fink (1970) impõe sérias objeções ao uso de linhagens comerciais por entender que: sempre contém material heterogêneo, ou seja, são híbridos formados por dois (2) organismos geneticamente distintos; não há como saber com certeza o estágio de crescimento do organismo do qual o "bolo" (cake) é formado; é difícil de se fazer uma análise genética, porque, se a linhagem for poliplóide, os mutantes dificilmente serão detectados. E ainda adverte: "bioquímicos e/ou geneticistas deveriam usar somente linhagens isogênicas (genomas iguais) em suas pesquisas".

McMurrough & Rose (1967) estudaram o efeito da taxa de crescimento e da limitação de substrato na composição e estrutura da parede celular de *S.cerevisiae*. Os dados apresentados mostraram que as proporções relativas dos polissacarídeos (glucana e manana) nas paredes da levedura, sob condições constantes, dependem largamente da natureza do substrato limitante imposto ao meio de cultura. A presença de maior proporção de glucana do que de manana nas paredes parece, no geral, estar associada ao crescimento em culturas que contém uma alta concentração de glucose. Esta observação pode, portanto, ser também pesquisada mais a fundo, a fim de se estabelecer as condições físicas ideais para aumentar o

rendimento do elicitor. Guzzo (1989) ressaltou a importância das mananas também ligadas em configuração β na constituição química do elicitor extracelular de uredíniosporos do patógeno do café (*Coffea arabica*) *Hemileia vastatrix*.

Power & Challinor (1969) relataram o crescimento de uma linhagem comercial de *S.cerevisiae* em meio de cultura sem inositol, o que resultou na formação de uma parede celular aberrante que continha menos manose e mais glicose do que as paredes das células crescidas em meio normal.

Sendo que a análise do teor de açúcares totais do lisado de células inclui carboidratos totais solúveis provenientes da célula como um todo e não purificados da parede, os resultados apresentados neste estudo são insuficientes para se determinar de qual parte da célula o fragmento elicitor de glicolina (β -glucana) é proveniente. Partindo-se do princípio da grande insolubilidade das glucanas da parede celular (Manners et al 1973) é pouco provável que estas tenham sido totalmente liberadas pelo processo mecânico utilizado para a lise, implicando na presença de glucanas não detectadas pelo método. Surpreendentemente, a literatura é pobre em relação aos mecanismos moleculares da biossíntese de glucanas em fungos. Segundo Farkas (1979), praticamente nenhuma atividade de síntese de glucanas foi encontrada no citoplasma. As propriedades físico-químicas das β -glucanas, como a sua insolubilidade e o alto grau de cristalinidade, indicam que a sua síntese ocorre mais provavelmente "in situ", na parede celular ou na superfície exterior do plasmalema.

Shematek & Calib (1980) estudaram as propriedades da enzima $\beta(1-3)$ glucanossintetase em leveduras, confirmando que a enzima está ligada à membrana plasmática. E mais, mostrando que sua atividade pode ser reversivelmente modificada por uma série de

condições, dependendo do ciclo celular, sendo estimulada por ATP ou GTP. Hien & Fleet (1983a) isolaram e caracterizaram seis (1-3) - β -glucanases diferentes de lisados de paredes celulares e extratos celulares de *S. cerevisiae*. Os autores confirmaram a observação de Shematek & Calib (1980) de que a atividade destas enzimas varia durante o crescimento vegetativo, durante a conjugação e durante a esporulação (Hien & Fleet, 1983b). Por outro lado, os carboidratos estão presentes também em outras membranas celulares. Segundo Barnett (1976), 5% de carboidratos são encontrados na constituição da membrana plasmática e parecem ser remanescentes da parede celular, o que poderia implicar na ocorrência de β -glucanas nesta região.

5-3 CRUZAMENTOS E OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS.

A linhagem ATCC-26698, por apresentar o maior teor de carboidratos totais solúveis entre as linhagens testadas, foi selecionada para o cruzamento. Entretanto, o resultado negativo de conjugação desta linhagem com as outras duas, 665-1A mat α e GRF-18 mat α , mostrou a sua incapacidade de cruzar com ambos os grupos de compatibilidade. Este fato confirma a hipótese da ATCC-26698 ser diplóide ou poliplóide. O cruzamento entre as linhagens 665.1A X GRF-18 proporcionou híbridos que apresentaram teores de carboidratos superiores aos pais. Este resultado confirma não só a questão da variabilidade existente no teor de carboidratos totais solúveis em diferentes linhagens, mas, também, o fato da ocorrência de linhagens com combinações genéticas favoráveis a maior produção de carboidratos. A discrepância dos valores encontrados entre tetrades de um mesmo asco poderia, possivelmente, ser atribuída a diferenças nas condições

de cultivo, já que a constituição do meio de cultura pode influenciar na formação da parede celular. Entretanto, existem dois aspectos a serem considerados: 1) as condições de cultivo foram rigorosamente controladas para que todas as linhagens tivessem o mesmo tratamento e fossem utilizadas no mesmo período do ciclo celular, 2) a graduação de valores obtidos caracteriza herança quantitativa e, como tal, muitos genes podem estar envolvidos. O estudo genético dos genes envolvidos nesta característica deverá ser feito por etapas, à medida que se identifiquem os tipos de açúcares presentes no lisado, que se consigam mutantes específicos e que se façam cruzamentos dialélicos para se indentificar combinações epistáticas e outras interações que possam apresentar. Até a última edição do mapa genético de *S. cerevisiae* (Mortimer & Schild, 1985) não se tinha mapeado qualquer gene que participasse da síntese de β - glucanas. Já foram mapeados os genes *mn₂* e *mn₄* relacionados às mananas (Ballou, 1975). O mapa genético é baseado principalmente em dados obtidos da análise de tétrades dos quatro (4) produtos meióticos (ascósporos) de células diplóides individuais. Em adição, alguns genes foram colocados no mapa através de análise de aneuploidias ou por recombinação mitótica.

5-4 ATIVIDADE ELICITORA MEDIDA ATRAVÉS DE BIOENSAIO

Após lise celular, as amostras provenientes de linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram submetidas ao bioensaio em cotilédone de soja e mostraram possuir atividade elicitora de fitoalexina. É sabido que a levedura *S.cerevisiae* possui, em suas paredes, um poderoso elicitor de gliceolina (Hahn & Albersheim, 1978). Também já foi

constatado que este elicitor é uma β -glucana com ligações 1-3 e 1-6 e, assim como o elicitor isolado de *Phytophthora megasperma* (Ayers et alii, 1976), a atividade relativa de cada fração que contém carboidratos é grosseiramente proporcional à quantidade de glucanas presente na fração. É importante se ter em mente esta última constatação quando se compara os dados da tabela X, que mostra o resultado dos bioensaios medidos através do valor A_{285nm} , e a quantidade de carboidratos presente em cada amostra, exibida na tabela XI. Comparando-se as duas tabelas, verifica-se que, em certos casos, não existe uma relação direta entre a quantidade de carboidratos presente na fração e sua atividade elicitora. Nota-se, por exemplo, que a linhagem vinte e um (21), que possui 60 Eq. em μg de glicose/ml a mais do que a linhagem vinte (20), não respondeu tão satisfatoriamente quanto esta. Por outro lado, a linhagem nove (9), que apresenta nível ainda menor (88 Eq. em μg de glicose/ml), demonstrou possuir a melhor atividade elicitora dentre as linhagens. As amostras quatro (4) e oito (8) apresentaram resultados próximos, sendo que a primeira contém apenas 14 Eq. em μg de glicose/ml enquanto a outra possui 102. Pelo teste estatístico, porém, apenas a linhagem quatro (4) não foi significativamente diferente do controle.

Dois resultados mais significativos foram obtidos. Primeiro, todas as amostras testadas (com exceção da de número quatro) acumularam quantidades detectáveis da fitoalexina gliceolina, em cotilédones de soja; e segundo, o acúmulo não foi diretamente proporcional aos teores de carboidratos presentes nas amostras. Sendo as β -glucanas responsáveis pela fração elicitora da amostra, pode-se inferir que a proporção de β -glucanas presentes é diferente em cada amostra. Quando se analisa a atividade elicitora relativa das amostras, este fato, é comprovado quando, por exemplo, se compara as linhagens de números oito(8) e nove (9). Sabendo-se que a atividade relativa é inversamente proporcional

à sua fração elicitora, pode-se inferir também que, embora a linhagem oito (8) seja bem mais rica em carboidratos do que a nove (9), esta última tem um poder de elicitação relativa mais elevado do que aquela. Estas observações são coerentes com o fato de que diferentes cepas de levedura podem diferir na proporção relativa dos dois (2) componentes e que também podem variar no grau de ramificação, como demonstrado por Manners et al.(1973b) e Manners at alii,(1974).

5-5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FRAÇÃO LISADA LEV-I

A variedade de soja IAC-8 foi selecionada para o bioensaio por apresentar resposta mais uniforme em relação a outras, testadas por Guzzo (1989), que obteve em ocasiões diferentes, valores médios de 0,742, 0,912 e 1,022 para atividade elicitora medida a A_{285nm} , empregando a mesma fração Lev-I e a mesma variedade de soja. Verifica-se, pois, uma diferença entre o menor e o maior valor, de 0,280nm. A autora obteve um valor médio, já descontado do valor controle, de 0,657.

Hahn & Albersheim (1978), trabalhando com a variedade de soja "Harosoy 63" e tendo como elicitor uma fração do extrato lisado comercial da levedura, obteve valores médios próximos de 0,682 já descontados do valor do controle. Comparando-se os dados obtidos por Guzzo(1989) com os apresentados neste estudo, observamos : a média do experimento foi de 0,684 que, descontado do valor obtido para o controle, fica igual a 0,429; o valor 0,684 apresenta uma diferença de 0,058 em relação ao primeiro valor de Guzzo (1989), de 0,238 em relação ao segundo valor e de 0,338 em relação ao terceiro valor,

portanto, uma diferença média de 0,211; o valor médio de 0,429 foi inferior aos apresentados pelos autores citados, constatando-se uma diferença de 0,253 em relação aos dados de Hahn & Albersheim (1978) e de 0,228 em relação aos de Guzzo (1989). Este último valor não fica longe da diferença média de 0,211, encontrada quando se comparou os valores dos três ensaios biológicos anteriormente citados.

Aparentemente, a magnitude dos desvios encontrados pode levar a acreditar que os resultados são erráticos (principalmente os que se referem à média descontada do controle). Porém, não deve ser esquecido que estas diferenças permitem que facilmente se constate, não só a importância da pureza das sementes empregadas (principalmente quanto a fatores genéticos), mas, também, as alterações de natureza física, como o clima durante a semeadura, a conservação das sementes, as condições da safra, o poder de germinação, entre outros, que possam afetar a sua qualidade e, ainda, as condições experimentais de laboratório (temperatura, luz, umidade etc). Levando-se em conta que no Brasil, estas variações podem de fato ocorrer, não é difícil de se imaginar tal situação. Por outro lado, não existe na literatura qualquer trabalho que afirme, com segurança, até que ponto esta diferença é significativa ou não. O fato é que, nas condições em que foi realizada esta pesquisa, o resultado mais esperado foi alcançado: o de elicitar a produção de fitoalexina na soja, confirmando os dados de outros autores e mostrando, mais uma vez, que nossos dados são consistentes com a pressuposição de que uma planta hospedeira pode reconhecer uma β -glucana produzida por um microrganismo, independente de este ser ou não patógeno e, como resultado, iniciar a produção de fitoalexinas. Esta descoberta já foi observada em vários sistemas patógeno-hospedeiro. Ayers et al (1974) demonstraram que β -glucanas de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* podem iniciar a síntese de fitoalexinas em tecidos do hospedeiro deste fungo, a soja. Anderson-Prouty & Albersheim (1975) demonstraram a

existência de um elicitor em *Colletotrichum lindemuthianum* extremamente ativo na indução da síntese de fitoalexina. Lisker & Kuc (1977) encontraram muitos fungos, incluindo várias espécies de *Phytophthora*, contendo glucanas que acumulavam fitoalexina em batatas. Cline et alii (1978) demonstraram o acúmulo de rhisitina em batatas e de compostos fungistáticos em feijão, após exposição a β - glucanas contidas nos micélios de *P. megasperma*, em células da levedura *S. cerevisiae* e nas paredes celulares de *C. lindemuthianum*. Guzzo et alii (1987) e Guzzo (1989) mostraram a existência de um indutor extracelular proveniente de uredíniosporos autoclavados do patógeno do café, *Hemileia vastatrix*. Mais recentemente, Guzzo et alii (1991) mostraram a proteção sistêmica de plantas de café com exopolissacarídeos derivados de *Xantomonas campestris*.

5-6 PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA *S. cerevisiae* NO CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS.

Roveratti (1989) testou a levedura *S. cerevisiae* em plantas de café e verificou que suspensão de células da levedura, ao depositar-se sobre as folhas, impede a aderência necessária dos uredíniosporos, para que eles possam germinar e infectar as folhas exercendo, assim, um tipo de controle biológico. Silva, (citado por Moraes, 1992), demonstrou que a antracnose do milho pode ser controlada em experimentos de casa de vegetação pela inoculação prévia das folhas com uma suspensão ou filtrado de células de *S. cerevisiae*. Segundo Moraes (1992), o emprego do fermento biológico comercial Fleishmann foi testado como meio de controle da ferrugem do café no campo, por um ano agrícola. Apesar dos resultados não terem sido muito animadores, foi observado, no período de rebrota, que as

plantas tratadas com o fermento se apresentavam mais vigorosas e mais enfolhadas. Em muitos países já existem projetos sendo executados a nível de campo, em culturas comerciais. No Brasil esta experiência ainda é muito restrita e apenas insipiente. Moraes (1992) cita fatores que podem interferir no êxito do tratamento a nível de campo: condições ambientais, níveis iniciais do potencial do inóculo, variedade do hospedeiro, tipo de indutor utilizado, concentração do indutor, intervalo entre as aplicações, entre outros. Muitos problemas ainda precisam ser superados para que se torne viável o uso de métodos alternativos de controle. Dentre eles pode-se citar a falta de uma pesquisa orientada para produção de indutores mais eficientes e com menor custo. A indução de proteção, assim como o controle biológico, estão enquadrados sob a denominação genérica de controle alternativo e não fazem uso de defensivos agrícolas. Para que estes métodos sejam empregados no campo, muitos problemas devem ser contornados. Estudos, como o aqui apresentado, são necessários para o esclarecimento de alguns aspectos básicos dos mecanismos de reconhecimento e de resposta das plantas, assim como dos aspectos genéticos envolvidos no processo.

Nenhum outro grupo de organismo tem sido mais intimamente associado com o progresso do bem - estar da raça humana do que as leveduras. A sua contribuição se faz sentir na capacidade de determinadas linhagens converterem eficientemente açúcar em álcool e dióxido de carbono e conduzirem uma fermentação alcóolica de líquidos açucarados. Frequentemente se diz que as leveduras são as mais antigas plantas cultivadas. A maioria dos estudos genéticos e bioquímicos são feitos utilizando-se *S. cerevisiae*, por ser um organismo de fácil manejo em laboratório, tendo a vantagem de não ser patogênico. As perspectivas de utilização deste microrganismo na indução de proteção em plantas, representa um amplo campo de trabalho e abre outros tantos na área da biologia molecular.

6-CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, neste trabalho, permitiram chegar às seguintes conclusões:

1- O açúcar presente na fração "lavado" é resíduo do meio de cultura e não proveniente do metabolismo celular. A levedura *S. cerevisiae* não produz polissacarídeos extracelulares em quantidades detectáveis pelo método utilizado.

2- Existe variabilidade genética no conteúdo de carboidratos totais solúveis em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

3- Linhagens não comerciais de *S. cerevisiae* são capazes de estimular a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja.

4- O cruzamento entre linhagens compatíveis pode resultar em híbridos que apresentem combinações genéticas favoráveis a um bom elicitor de fitoalexina, como o alto teor de carboidratos ligados em configuração β .

5- O teor de carboidratos totais solúveis mostrou ser um marcador genético importante para a seleção de linhagens de *S. cerevisiae* destinadas à indução de fitoalexinas.

6- O teor de "carboidratos totais solúveis" em *S. cerevisiae* mostrou ser determinado por fatores genéticos quantitativos, não se estabelecendo, entretanto, o número de genes envolvidos.

7- A fração lisada da levedura *S. cerevisiae* possui atividade elicitora inespecífica, sendo capaz de desencadear a formação de fitoalexinas em uma planta não-hospedeira, como a soja.

8- A fração lisada das linhagens testadas em bioensaio possuem teores variáveis de β -glucanas, como foi demonstrado pelas atividades elicitoras relativas das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-AL, A.T.H & PHAFF, H.J. 1968. Exo- β -glucanases in yeast. *Biochem.J.*, **109**: 347-360.
- ALBERSHEIM, P. & VALENT, B. 1978. Host-pathogen interactions in plants. Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol. New York*, **78**: 627-643.
- ALLEN, E.H. & KUC, J. 1968. α -Solanine and α -chaconine as fungitoxic compounds in extracts of irish potato tubers. *Phytopath.*, **58**: 776-781.
- ANDERSON, A. 1978. Initiation of resistant responses in bean by mycelial wall fractions from three races of the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Can. J. Bot.*, **56**: 2247- 2251.
- ANDERSON-PROUTY, A.J & ALBERSHEIM, P. 1975. Host-pathogen interactions. VIII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. *Plant Physiol.*, **56**: 286-291.

- AYERS, A.R; EBEL, J & ALBERSHEIM, P. 1974. A highly potent elicitor of hydroxyphaseollin synthesis in soybean tissues has been purified from the culture filtrates of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Proc. Am. Phytopathol. Soc.**, 1:23.
- AYERS, A.R; EBEL, J; FINELLI, F; BERGER, N. & ALBERSHEIM, P. 1976a. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiol.**, 57: 751-759.
- AYERS, A.R; EBEL, J; VALENT, B & ALBERSHEIM, P. 1976b. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant. physiolog.**, 57: 760-765.
- AYERS, A. R; VALENT, B; EBEL, J & ALBERSHEIM, P. 1976c. Host-pathogen interaction. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. **Plant. physiol.**, 57:766-774.
- AYERS, A. R; GOODELL, J. J. & DeANGELIS, P. L. 1985. Plant detection of pathogens. **Recent Advances in Phytochemistry.**, 19: 1-20.
- BACON, S.D. & FARMER, V.C. 1968. The presence of a predominantly $\beta(1-6)$ component in preparations of yeast glucans. **Biochem. J.**, 110: 34p.
- BACON, J. S. D; FARMER, D. J; & TAYLOR, I. F. 1969. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. **Biochem. J.**, 114: 557-567.

- BALLOU, D.L. 1975. Genetic control of yeast mannan structure: mapping genes *mnn2* and *mnn4* in *S. cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **123**: 616-619.
- BARNETT, J. A. 1976. The utilization of sugars by yeasts. *Adv. in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **32**:125-234.
- BONHOFF, A. & GRISEBACH, H. 1988. Elicitor-induced accumulation of glyceollin and callose in soybean roots and localized resistance against *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Science*, **54**: 203-209.
- BURDEN, R. S. & BAILEY, J. A. 1975. Structure of the phytoalexin from soybean. *Phytochem.*, **14** : 1389-1390.
- CALLOW, J. A; ESTRADA-GARCIA, M. T. & GREEN, J. R. 1987. Recognition of Non-self: the causation and avoidance of disease. *Ann. of Bot.*, **60**(4): 3-14.
- CHEONG, J-J; BILBERG, W; FÜGEDLP; PILOTTLA; GAREGG, P.J; HONG, N; OGAWA, T & HAHN, M. 1991. Structure-activity relationship of oligo- β -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in Soybean. *Plant Cell*, **3**: 127-136.
- CHEONG, J-J & HAHN, M.G. 1991. A specific, high-affinity binding site for the hepta- β -glucoside elicitor exists in Soybean membranes. *Plant Cell*, **3**: 137-147.
- CLINE, K; WADE, M & ALBERSHEIM, P. 1978. Host-pathogen interaction. XV. Fungal glucans which elicit phytoalexin accumulation in soybean also elicit the accumulation of phytoalexin in other plants. *Plant Physiol.*, **62** :918-921.

- COSIO, E. G; PÖPPERL, H; SCHMDT, W.E & EBEL,J. 1988. High-affinity binding of fungal β -glucan fragments to soybean (*Glycine max* L.) microsomal fractions and protoplasts. *Eur. J. Biochem.* 175: 309-315.
- CRUICKSHANK, I. A. M. & PERRIN, D. R. 1960. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature*, 187:799-800.
- CRUICKSHANK, I. A. M. & PERRIN, D. R. 1965a. Studies on phytoalexins. VIII. The effect of some further factors on the formation, stability, and localization of pisatin "in vivo". *Austral J. Biol. Sci.*, 18: 817-828.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & PERRIN, D. R. 1965b. Studies on Phytoalexins. IX. Pisatin formation by cultivars of *Pisum sativum* L. and several other *Pisum* species.
- CRUICKSHANK, I. A. M & PERRIN, D. R. 1968. The isolation and partial characterization of Monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sci.*, 7(10): 449-458.
- DARVILL, A. G & ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35 : 243-275.
- DISHE, Z. 1962. General color reaction. In: WHISTLER, R. L. AND WOLFROM, M. L., ed. *Methods in Carbohydrate chemistry*. Academic Press, vol,1 :478-512.
- DOKE, N; GARAS, W.A & KUC,J. 1979. Partial characterization and aspects of the mode of action of a hypersensitivity-inhibiting factor (HIF) isolated from *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant. Pathol.* 15:127-140.

- DUFFUS, J. H; LEVI, C. & MANNERS, D.J. 1982. Yeast cell-wall glucans. **Adv. Microb. physiol.**,**23**: 151-181.
- EBEL, J; AYERS, A. R; & ALBERSHEIM,P. 1976. Host-pathogen interactions. XII. Response of suspension-cultures soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. **Plant Physiol.**, **57**: 775-779.
- EBEL, J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Ann. Rev. Phytopathol.** **24**:235-264.
- FARKAS, V. 1979. Biosynthesis of cell walls of fungi. **Microbiol. Rev.**, 117-144.
- FINK, G. R. 1970. The biochemical genetics of yeast. in: **Methods Enzimol**, **17**:59-78.
- FLEET,G. H. & MANNERS, D. J. 1976. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*.**J.Gen. Microbiol****94**:180-192.
- FLEET,G. H. & MANNERS, D. J. 1977. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **98**: 315-327.
- GARAS, N. A; DOKE, N. & KUC, J. 1979. Suppression of the hypersensitive reaction in potato tubers by mycelial components from *Phytophthora infestans* **Physiol. Plant. Pathol.**,**15**:117-126.
- GUZZO, S. D; MARTINS, E. M. F. & MORAES, W. B. C. 1987. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix* I. Partial purification on the extracellular inducer from heat-killed urediniospors of the pathogen. **Fitopat. Bras.** **12(4)**: 377-385.

- GUZZO, S. D. 1989. Elicitação da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja (*glycine max*(L.) Merrill) por polissacarídeos extracelulares de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. **Dissertação de Mestrado**. ESALQ. Piracicaba. S.P. 152pp.
- GUZZO, S. D.; BACH, E. E.; MARTINS, E. M. F. & MORAES, W.B.C. 1991. Exopolysaccharides from *Xanthomonas campestris* PV. *Manihotis* (Xcm) systemically protect coffee plants against *Hemileia vastatrix*. XII Congresso Internacional de Proteção de Plantas. Resumo. Rio de Janeiro.
- HAHN, M. G. & ALBERSHEIM, P. 1978. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiol**, **62**(1): 107-111.
- HAHN, M. G.; DARVILL, A. G. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiol**, **68**: 1161-1169.
- HIEN, N.H & FLEET, G.H. 1983A. Separation and characterization of six (1-3) β -glucanases from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol**. **156**: 1204-1213.
- HIEN, N. H & FLEET, G.H. 1983b. Variation of (1-3) β -glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during vegetative growth, conjugation and sporulation. **J. Bacteriol.**, **156**: 1214-1220.
- INGHAM, J. L. 1972. Phytoalexins and other natural products as factors in plant disease resistance. **Bot. Rev.**, **38**(3): 343- 424.
- JOHNSTON, J. R. & READER, H. P. 1983. Genetic control of flocculation. IN: YEAST GENETICS., Eds. SPENCER, J.F.T; SPENCER, D.M. & SMITH, A.R.W. Springer-

Verlag, New York. 533pp.

- KEEN, N. T; SIMS, J. J; ERWIN, D. C; RICE, E. & PARTRIDGE, J. E. 1971. 6a-Hydroxyphaseollin: an antifungal chemical induced in soybean hypocotyls by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Physiol. Pl. Pathol.**, 1: 265-275.
- KEEN, N. T; PARTRIDGE, J. E; ZAKI, A. I. 1972. Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Phytopath.**, 62:768.(Resumo).
- KEEN, N. T. 1975. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? **Science.**,187: 74-75.
- KEEN, N. T & LEGRAND, M. 1980. Surface glycoproteins: evidence that they may function as the race specific phytoalexin elicitors of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiol. Pl. Path.**, 17: 175-192.
- KEEN, N. T; YOSHIKAWA, M & WANG, M. C. 1983. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f.sp.*glycinea* and other sources. **Plant. Physiol.**,71: 466-471.
- KEEN, N. T. & YOSHIKAWA, M . 1983. β -1-3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant. Physiol.**, 71:460-465.
- KLARMAN, W. L. & GERDEMANN, J. W. 1963.Resistance of soybeans to three *Phytophthora* species due to the production of a phytoalexin.**Phytopath.**,53:1317-1320.
- KLARMAN, W. L. & SANFORD. 1968. Isolation and purification of an antifungal principle from infected soybeans.**Life Sci.**, 7: 1095-1103.

- KUC, J. 1972. Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopath.* **10**: 207-232.
- KUC, J. & RUSH, J. S. 1985. Phytoalexins. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**(2):455-472.
- LISKER, N. & KUC, J. 1977. Elicitors of terpenoid accumulation in potato tuber slices. *Phytopath.*, **67**: 1356-1359.
- LOWRY, O. H; ROSEBROUGH, N. J; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- LYNE, R. L; MULHEIRN, L.J; & LEWORTH, D. P. 1976. New pterocarpinoid phytoalexins of soybean. *J. Chem. Soc. Comm.*, London, 497-498.
- LYNE, R. L. & MULHEIRN, L. J. 1978. Minor pterocarpinoids of soybean. *Tetrahedron Lett.*, **34**: 3127-3128.
- MANNERS, D.J. & PATTERSON, J.C. 1966. A re-examination of the molecular structure of yeast glucan. *Biochem. J.*, **98**,19c.
- MANNERS, D. J; MASSON, A. J. & PATTERSON, J. C. 1973a. The structure of a β -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**: 19-30.
- MANNERS, D. J; MASSON, A. J; PATTERSON, J. C; BJØRNDAL, H & LINDBERG, B. 1973b. The structure of a β -(1-6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.*, **135**: 31-36.
- MANNERS, D. J; MASSON, A. J & PATTERSON, J. C. 1974. The heterogeneity of glucan preparations from the walls of various yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **80**: 411-417.

- MANSFIELD, J. W; HARGREAVES, J. A. & BOYLE, F. C. 1974. Phytoalexin production by live cells in broad bean leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Nature.*, **252**: 316.
- MCMURROUGH, J & ROSE, A.H. 1967. Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of *S.cerevisiae*. *Biochem.J.*, **105**: 189-203.
- MORAES, W.B.C. 1992. Controle alternativo de fitopatógenos. *Pesq. Agrop. Bras.*, **27**: 175-190.
- MORTIMER, R. K & SCHILD, D. 1985. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae* edition 9. *Microbiol. Rev.*, **49**: 181-212.
- MÜLLER, K. O. & BÖRGER, H. 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land-und Forstw., Berlin*, **23**: 189-231.
- NICKERSON, W.J. 1963. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. IV. Molecular bases of form in yeasts. *Bacteriol. Rev.*, **27**: 305-324.
- NORTHCOTE, D.H. & HORNE, R.W. 1952. The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochem. J.*, **51**: 232-236.
- PAXTON, J. D. 1981. Phytoalexins - a working redefinition. *Phytopath.Z.*, **101**: 106-109.
- PERRIN, D. R. & CRUICKSHANK, I. A. M. 1965. Studies on phytoalexins. VII. Chemical stimulation of pisatin formation in *Pisum sativum* L. *Aust. J. Biol. Sci.*, **18**: 803- 816.
- PHAFF, H. J. 1963. Cell wall of yeasts. *Ann Rev. Microbiol.*, **17**: 15-30.

- POLAKIS, E. S. & BARTLEY, W. 1966. Changes in dry weight, protein, desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and reserve and structural carbohydrate during the aerobic growth cycle of yeast. *Biochem.J.*, **68**: 883-887.
- POWER, D. M. & CHALLINOR, S. W. 1969. The effects of inositol-deficiency on the chemical composition of the yeast cell wall. *J. Gen. Microbiol.*, **55**: 169-176.
- RATHMELL, W. G. & BENDALL, D. S. 1971. Phenolic compounds in relation to phytoalexins biosynthesis in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant. Pathol.*, **1**: 351-362.
- ROVERATTI, D. S. 1989. Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk, et Br. por *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. **Dissertação de Mestrado**. ESALQ. Piracicaba. S. P. 94pp.
- RYAN, C. A. & FARMER, E. 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Bio.*, **42**: 651-674.
- SHARP, J.K; ALBERSHEIM, P; OSSOWSKI, P; PILOTTA; GAREGG, P.J; & LINDBERG, B. 1984a. Comparison of the structures and elicitor activities of a synthetic and a mycelial-wall-derived hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitol. *J. Biol. Chem.*, **259**: 11341-11345.
- SHARP, J.K; McNEIL, M; & ALBERSHEIM, P. 1984b. 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*. *J. Biol. Chem.*, **259**: 11321-11336.

- SHARP, J.K; VALENT,B; & ALBERSHEIM, P. 1984c. Purification and parcial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.*, **259**: 11312-11320.
- SHIMIDT, W.E; & EBEL, J. 1987. Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max* .*Proc. Natl. Acad. Sci* **84**: 4117-4121. USA.
- SHEMATEK, E. M. & CABIB, E. 1980a. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of β -(1-3) glucan synthetase.*J. Biol. Chem.* **255(3)**: 888-894.
- SHEMATEK, E. M. & CABIB, E. 1980b. Biosynthesis of the yeast cell wall.II. Regulation of β -(1-3) glucan synthetase by ATP and GTP.*J. Biol. Chem.* **255(3)**: 895-902.
- TOMIYAMA, K; SAKUMA, T; ISHIZAKA, N; SATO, N; KATSUI, H; TAKAGUSI,M; & MASAMUNE, T.1968. A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens.*Phytopath.*, **58**: 115-116.
- VERNETTI, F.J. 1983. Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras. *Fundação Cargill*, vol .I Campinas. S.P. 463pp.
- WEINSTEIN, L. I; HAHN, M. G; ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen interactions. XVIII. Isolation and biological activity of glycinol, a pterocarpan phytoalexin synthesised by soybeans. *Plant. Physiol.*, **68**358-363.
- YOSHIKAWA, M. 1978. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Nature*, **275**: 546-547.

- YOSHIKAWA, M; YAMANCHI, K. & MASAGO, H. 1979. Biosynthesis and biodegradation of glyceolin by soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Physiol. Plant. Pathol.**, **14**:157-169.
- YOSHIKAWA, M; MATAMA, M; MASAGO, H. 1981. Release of a soluble phytoalexin elicitor from mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* by soybean tissues. **Plant. Physiol.**, **67**: 1032-1035.
- YOSHIKAWA, M; KEEN, N. T. & WANG, M. C. 1983. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. **Plant Physiol.**, **73**: 497-506.
- ZIEGLER, E & ALBERSHEIM, P. 1977. Host-pathogen interactions XIII. Extracellular invertases secreted by three races of a plant pathogen are glycoproteins which possess different carbohydrate structures. **Plant. Physiol.**, **59**: 1104-1110.
- ZIEGLER, E. & PONTZEN, R. 1982. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by an extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Physiol. Plant. Pathol.**, **20**: 321-331.