SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Luzia Valentina Modolo

PRODUÇÃO DE FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA RESPOSTA DE DEFESA DE SOJA AO FUNGO CAUSADOR DO CANCRO DA HASTE

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Luzia Valentina Modolo e aprovada pela Comissão Julgadora. Ione Salgado

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE CB
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
M721p
V. Ex.
TOMBO BC/ 46892
PROC. 16-392/01
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 02/11/01
N.º CPD

CM00161216-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Modolo, Luzia Valentina

M721p Produção de flavonóides e atividade óxido nítrico sintase na resposta de defesa de soja ao fungo causador do cancro da haste/ Luzia Valentina Modolo. -- Campinas, SP.[s.n.], 2001

80f: ilus.

Orientadora: Ione Salgado

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

1. Óxido nítrico. 2. Flavonóides. 3. Fitoalexinas. I. Salgado, Ione. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IIII. Título.

Data da Defesa: 27/08/2001

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora) _____

Assinatura

Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa _____

Assinatura

Profa. Dra. Márcia Regina Braga _____

Assinatura

Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira _____

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

"Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive."

Fernando Pessoa

Esta tese é carinhosamente

dedicada à minha mãe Alzerina

e ao meu esposo Ângelo.

AGRADECIMENTOS

- Meu sincero agradecimento aos membros e às pessoas que passaram pelo laboratório de Bioquímica de Plantas no período em que desenvolvi este trabalho de tese. A acolhida, o compartilhamento de momentos sérios e também de descontração, além de eventuais ajudas em experimentos, são características desta "família científica" que jamais serão esquecidas.

- Aos colegas do laboratório da FMRP-USP pelo carinho, hospedagem e preocupação e aos alunos da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo pela receptibilidade.

- Às secretárias Andréia e Marina, pela amizade e auxílio nos processos burocráticos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- À Deus, por me proporcionar saúde e força de vontade para desenvolver esta atividade.

- À Profa. Dra. Ione Salgado pela importante orientação, experiência científica e seriedade. Obrigada pela oportunidade e, acima de tudo, por acreditar na minha capacidade.

- À FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro e concessão de bolsa.

- Aos Drs. Márcia R. Braga (Instituto de Botânica, São Paulo), Florinda Bobbio e Paulo A. Bobbio (*in memoriam*) (Química de Alimentos, UNICAMP) por disponibilizarem o equipamento de HPLC nas análises, essenciais à conclusão deste trabalho.

- Ao Prof. Dr. Fernando Q. Cunha (FMRP, USP) pela orientação e sugestões na condução dos experimentos de medida da Atividade NOS, bem como, preocupação quanto às acomodações em Ribeirão Preto.

- Aos professores Dra. Carmen V. Ferreira, Dra. Cibele M. C. P. Gouvêa, Dra. Márcia R. Braga e Dr. Marcos A. Machado pelas valiosas sugestões junto à versão escrita desta tese.

- Aos Drs. Margarida F. Ito e Nelson R. Braga do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) por gentilmente fornecerem cepas do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* e sementes de soja, respectivamente.

- À Jusceley F. P. de Oliveira (Bioquímica, UNICAMP) pela dedicada contribuição junto aos experimentos seja direta ou indiretamente.

- À Fabíola L. A. C. Mestriner (FMRP, USP) pelo eficiente treinamento na técnica de determinação de Atividade NOS.

- Ao Rodrigo R. Catharino por muito auxiliar no manuseio e operação do equipamento de HPLC.

- Aos meus pais Alzerina A. Modolo e Ângelo Modolo (*in memoriam*) que, além do amor e carinho indescritíveis, muito me incentivaram ensinando o conceito de persistência. Mãezinha, sua coragem e espírito de luta me permitiram chegar até aqui.

- Minha gratidão à Agostinho, Carmem, Domingos (*in memoriam*), Luiz (*in memoriam*), Sebastião e Tarcísio Carlos, meus irmãos queridos, simplesmente por fazerem parte da minha vida, me amando. Tarcísio (paizão) não encontrei quaisquer palavras capazes de expressar meu reconhecimento pelo seu grande incentivo. Agradeço todos os meus familiares.

- Ao Ângelo, meu esposo, pelo ser humano que é: amável, compreensivo, conselheiro, minha eterna gratidão. Divido com você essa imensa alegria. Esta tese é um pouco sua! Obrigada sogrão Manoel e sogrinha Nadir por cuidarem dele para mim.

- A você, por prestigiar este trabalho com o seu interesse e leitura.

ÍNDICE

Abreviaturas..... ix

Resumo..... xi

Abstract..... xiii

1. Introdução

Óxido nítrico (monóxido de nitrogênio)..... 1

Os alvos moleculares do NO..... 2

A óxido nítrico sintase de mamíferos..... 3

A produção do NO em plantas..... 5

Ações do NO em plantas..... 6

A NOS de vegetais..... 7

A NOS no mecanismo de resistência a fitopatógenos..... 8

A via dos fenilpropanóides..... 9

O cancro da haste da soja..... 12

2. Objetivos..... 15

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal..... 16

3.2. Preparo da solução eliciadora do fungo Dpm..... 16

3.3. Eliciação de cotilédones de soja com extrato de Dpm e SNP..... 17

3.4. Eliciação de cotilédones de soja pré-tratados com inibidores da NOS de origem animal..... 18

3.5. Identificação de flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.5.1. Preparo das amostras 20

3.5.2. Processo cromatográfico 21

3.6. Medida da atividade NOS 21

4. Resultados

4.1. Estabelecimento de parâmetros para a eliciação de cotilédones de soja com extrato do fungo Dpm 23

4.2. Estímulo da produção de fitoalexinas em cotilédones de soja eliciados por SNP 28

4.3. Efeito de inibidores de NOS na produção de fitoalexinas 30

4.4. Identificação, por CLAE, dos flavonóides produzidos em resposta à eliciação 34

4.5. Indução de atividade óxido nítrico sintase em cotilédones eliciados 45

5. Discussão 51

6. Referências bibliográficas 57

ABREVIATURAS

cADPR	Adenosina difosfato-ribose cíclica
AMG	Aminoguanidina
Ap	Apigenina
BDA	Meio batata-dextrose-ágar
BH_4	(6*R*)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino
CA4H	Ácido cinâmico 4-hidroxilase
CaM	Calmodulina
CHI	Chalcona isomerase
CHR	Chalcona redutase
CHS	Chalcona sintase
4CL	4-coumarato:coenzima A ligase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Dpm	Fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*
DTT	Ditiotreitol
Dz	Daidzeína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
Fe-S	Centro ferro-enxofre
cGMP	Guanosina-3',5'-monofosfato

Gs	Gliceolinas I, II e III
SNAP	*S*-nitroso-N-acetilpenicilamina
GSNO	*S*-nitrosoglutationa
Gt	Genisteína
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanossulfônico
IFS	Isoflavona sintase
IRO's	Intermediários reativos de oxigênio
Lt	Luteolina
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico
L-NAME	N^G-Nitro-L-arginina metil éster
L-NIL	L-N^6-(1-iminoetil) lisina
L-NNA	N^G-Nitro-L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintase
NR	Nitrato redutase
PAL	Fenilalanina amônia liase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilssulfonila
PR	Patogênese-relacionado(a)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RH	Reação de hipersensibilidade
SNP	Nitroprussiato de sódio
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris-HCl	Tris-(hidroximetil) aminometano

RESUMO

O presente trabalho analisou a participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na produção de fitoalexinas, como parte do mecanismo de defesa de soja ao ataque do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm), causador da doença do cancro da haste. A produção de fitoalexinas e a atividade NOS em cotilédones de soja eliciados com extrato do fungo Dpm foram comparadas com aquela induzida por nitroprussiato de sódio (SNP), uma molécula capaz de liberar óxido nítrico (NO). Os flavonóides produzidos foram identificados e quantificados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e padrões autênticos. A atividade NOS foi determinada pela síntese de L-[U-^{14}C] citrulina a partir de L-[U-^{14}C] arginina. A eliciação dos cotilédones de soja com o extrato de Dpm ou com SNP induziu intensa produção de fitoalexinas. Não foi observada produção de fitoalexinas quando o SNP foi substituído por ferricianeto que difere estruturalmente do primeiro apenas por não conter o NO. A produção de fitoalexinas induzida pelo extrato de Dpm, mas não aquela induzida por SNP, foi inibida quando os cotilédones de soja foram pré-tratados com inibidores característicos da enzima NOS de origem animal. A eliciação com Dpm induziu também atividade NOS nos tecidos em contato com o eliciador, atividade não observada nos tecidos eliciados por SNP. A atividade NOS induzida mostrou ser dependente de Ca^{2+} e NADPH e foi inibida por L-NAME [N^G-nitro-L-arginina metil éster], AMG [Aminoguanidina] e L-NIL [L-N^6-(1-iminoetil) lisina], inibidores característicos da NOS de origem animal. A indução de atividade NOS precedeu a ativação da produção de flavonóides nos cotilédones eliciados por Dpm. O acúmulo destes metabólitos foi mais precoce quando os cotilédones foram eliciados com SNP. O conjunto de

resultados sugeriu que na eliciação por Dpm ocorreu a ativação de uma enzima do tipo NOS produzindo NO que foi capaz então de induzir a produção de flavonóides que apresentam atividade antimicrobiana. Não foram observadas diferenças significativas na produção de fitoalexinas pelos cotilédones entre os cultivares IAC-18 e IAC-14, resistente e suscetível ao Dpm, respectivamente. Estes resultados indicaram que ambos os cultivares seriam capazes de se defender ao ataque do patógeno nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta.

ABSTRACT

The formation of phytoalexin is part of the defense mechanism of soybeans against the fungus *Diaporthe phaseolorum* f. sp. m*eridionalis* (Dpm), the causal agent of stem canker disease. In this work, the involvement of nitric oxide synthase (NOS) in phytoalexin production was examined. Phytoalexin formation and NOS activity in soybean cotyledons stimulated with a Dpm extract were compared with the levels in cotyledons exposed to sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide (NO) donor. The flavonoids were identified and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using authentic standards. NOS activity was determined by the biosynthesis of L-[U-^{14}C] citrulline from L-[U-^{14}C] arginine. Exposure of soybean cotyledons to the Dpm extract or SNP resulted in a high accumulation of phytoalexin, but this was not observed when SNP was replaced by ferricyanide, a structural analog of SNP devoid of the NO moiety. Phytoalexin production induced by the Dpm extract, but not by SNP, was prevented when the cotyledons were pretreated with NOS inhibitors. The Dpm extract also induced NOS activity in soybean cotyledon tissue proximal to the site of extract application. No such activity was observed with SNP. The induced NOS activity was Ca^{2+}- and NADPH-dependent and was sensitive to the NOS inhibitors L-NAME [N^G-nitro-L-arginine methyl ester], AMG [aminoguanidine] and L-NIL [L-N^6-(iminoethyl) lysine]. The induction of NOS activity preceded the maximal accumulation of flavonoids in cotyledons exposed to the Dpm extract. The accumulation of these metabolites was faster in SNP than in Dpm treated cotyledons. These results suggest that Dpm extract induce NOS activity, with the formation of NO subsequently stimulating biosynthesis of flavonoids. There was no significant difference in the phytoalexin accumulation between

cotyledons from cultivars IAC-18 and IAC-14 which are resistant and susceptible to Dpm, respectively. Thus, both cultivars should be able to defend themselves against attacks by pathogens in the earlier stages of plant development.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SEÇÃO CIRCULANTE

1. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (monóxido de nitrogênio)

O nitrogênio tem um papel central nos seres vivos, haja visto que está presente em todas as maiores classes de biomoléculas. Entretanto, apenas recentemente um papel fisiológico foi descoberto para as espécies reativas de nitrogênio (ERN's). Isto aconteceu após a descoberta de que o óxido nítrico, NO, a mais simples molécula formada de nitrogênio e oxigênio era produzida *in vivo*. Desde então, o estudo dos efeitos e ações do NO em animais despertaram grande interesse nas mais diversas áreas das ciências biológicas. Em 1992, o NO foi eleito pela revista *Science* como "A Molécula do Ano". Em 1998, Ferid Murad, Louis Ignarro e Robert Furchgott receberam o prêmio Nobel de Medicina por demonstrarem que o NO produzido a partir da oxidação da L-arginina à L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) atua como sinalizador em células animais. Por mais de cinqüenta anos a única molécula no estado gasoso conhecida com função sinalizadora foi o etileno, um fitormônio que estimula o amadurecimento de frutos e provoca a abscisão de frutos e folhas. O crescente interesse e rápido progresso no estudo da enzima NOS de mamíferos revelou que o NO é uma potente molécula, capaz de controlar e influenciar uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos.

O NO foi inicialmente descoberto como uma molécula sinalizadora fundamental na manutenção da pressão sangüínea no sistema cardiovascular, na modulação da transmissão neural no cérebro e na estimulação das defesas do hospedeiro no sistema imune (Moncada *et al.*,1991). Posteriormente, foi sugerido que o NO podia estar

envolvido na regulação da expressão gênica, no aprendizado e na memória, na agregação plaquetária, na função sexual masculina, na citotoxicidade e como um estimulador da apoptose (Jaffrey *et al.*, 1995; Palevitz e Lewis, 1998). Ainda, níveis reduzidos de NO têm sido associados à fisiopatologia da pré-eclampsia (Lowe, 2000), ao desenvolvimento da aterosclerose (Stuehr, 1997) e à distrofia muscular de Duchenne (Sander *et al.*, 2000). Produção excessiva desta molécula contribui para o aparecimento de doenças neurodegenerativas como a de Huntington, Alzheimer e esclerose amiotrópica lateral (Chabrier *et al.*, 2000).

Os alvos moleculares do NO

O NO apresenta um elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio, o que torna esta molécula instável e quimicamente reativa (Wojtaszek, 2000). Ainda, a natureza altamente lipofílica deste radical permite sua fácil difusão através de membranas celulares sem a presença de transportadores específicos, o que o torna potencialmente tóxico (Mayer e Hemmens, 1997). Assim, o NO não atua através da ativação de receptores, mas sim, formando ligações covalentes com suas moléculas-alvo, através de vários mecanismos diferentes.

Alvos potenciais da ação do NO incluem proteínas que contêm metais de transição seja como grupo heme ou complexos não-hêmicos, principalmente as que apresentam centros ferro-enxofre (Fe-S), onde adutos NO-Fe-S são formados.

O NO é capaz de reagir com a tirosina, formando resíduos de nitrosotirosina, que podem provocar a inibição da atividade enzimática de certas proteínas, ou reagir com grupamentos sulfidrilas para formar *S*-nitrosotióis. A nitrosilação de grupos tióis parece

ser um recurso utilizado pela célula para aumentar a eficiência de entrega do NO ao seu sítio de ação (Gaston, 1999). Em geral, compostos resultantes da reação do NO com outras moléculas, dependendo da localização, estrutura e reatividade, seriam considerados elementos de transporte/armazenamento ou produtos finais de degradação deste radical (Wojtaszek, 2000).

Quando produzido em altas concentrações, o NO pode reagir com intermediários reativos de oxigênio (IRO's) levando à produção de espécies mais reativas como o peroxinitrito ou o radical hidroxil com efeitos citotóxicos (Stamler *et al.*, 1992; Mayer e Hemmens, 1997). Por outro lado, a reação do NO com radicais livres poderia funcionar como bloqueio da propagação das cadeias de oxidação mediadas por radicais limitando o dano celular (Beligni e Lamattina, 1999a,b).

Logo, o NO apresenta um comportamento dual que advém de sua reatividade bioquímica: é reativo o suficiente para explicar a habilidade em atuar simultaneamente como um mediador de diversas funções fisiológicas bem como de mecanismos de doenças (Beligni e Lamattina, 1999a).

A óxido nítrico sintase de mamíferos

Em mamíferos, a produção intracelular de NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Basicamente, o mecanismo de ação da NOS é a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina com liberação de NO. Como co-substratos são utilizados O_2 e NADPH. A NOS é uma proteína homodimérica contendo FAD, FMN, tetrahidrobiopterina e o heme como grupos prostéticos. Também apresenta sítios de ligação para L-arginina, calmodulina e NADPH (Stuehr, 1997).

Durante a formação do NO, os elétrons do NADPH são transferidos para as flavinas e então para o ferro hêmico. Esta transferência de elétrons permite a NOS ligar oxigênio e catalisar a reação de oxidação, em dois passos, da L-arginina para L-citrulina (Figura 1).

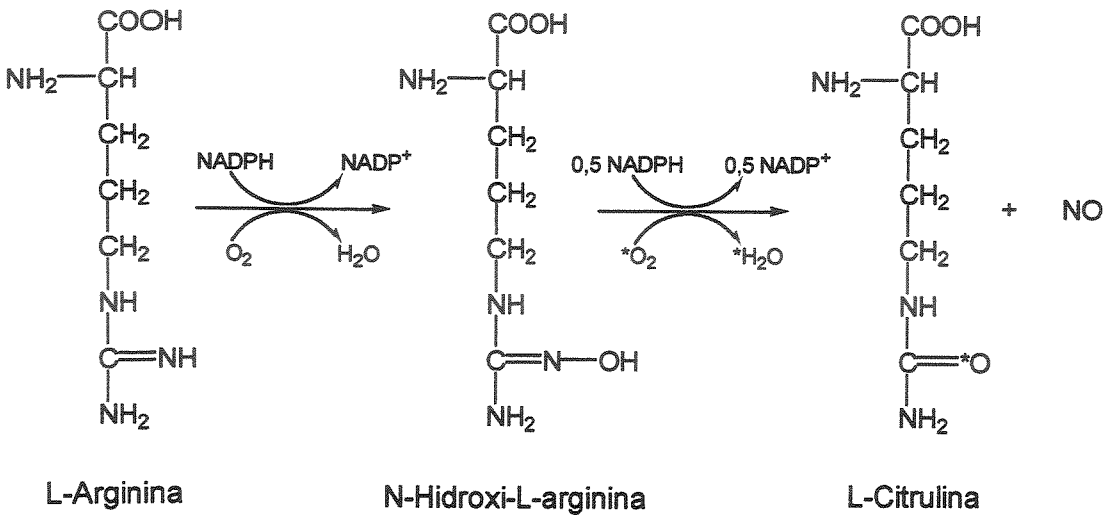

Figura 1: Biossíntese do NO (via NOS) segundo Stuehr, 1999.

A NOS apresenta três domínios funcionalmente distintos: o domínio oxigenase na região N-terminal, que liga o grupo heme; o domínio redutase na região C-terminal e o sítio de ligação para a calmodulina na região intermediária (Stuehr, 1999).

Em humanos já foram identificadas três principais isoformas classificadas como NOS I, NOS II e NOS III, segundo a ordem cronológica de isolamento das proteínas e dos cDNA's correspondentes (Förstermann *et al.*, 1991). Embora as três isoformas liguem calmodulina, na NOS II a calmodulina se encontra permanentemente ligada, o que permite esta isoforma estar ativa mesmo em situações onde a concentração de Ca^{2+} livre citossólico esteja bastante diminuída. Por esta característica, a NOS II é

considerada Ca^{2+}-independente, enquanto que, as isoformas I e III são Ca^{2+}-dependentes, produzindo quantidades moderadas de NO, uma vez que a atividade destas isoformas varia em função da flutuação dos níveis citossólicos de Ca^{2+}. Por outro lado, a NOS II é cataliticamente ativa logo após a sua transcrição, que é principalmente induzida por lipopolissacarídeos bacterianos e citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1α e fator de necrose tumoral-β) para produzir NO em grandes quantidades, com função citotóxica (Förstermann *et al.*, 1991; Stuer, 1992; Bogdan, 2001).

A produção do NO em plantas

Até recentemente, pesquisas sobre os efeitos do NO em plantas, centravam-se na poluição atmosférica por óxidos de nitrogênio: NO e NO_2 (dióxido de nitrogênio). A captação de NO pelas folhas bem como, seu subseqüente metabolismo e fitotoxicidade, estão bem documentados (Wellburn, 1990; Hufton *et al.*, 1996). Já foi demonstrado que as plantas não só respondem ao NO atmosférico, mas também são capazes de produzir quantidades substanciais deste radical (Wildt *et al.*, 1997).

Em plantas, o NO pode ser produzido não-enzimaticamente, a partir da conversão de NO_2 por carotenóides, num processo mediado pela luz (Cooney *et al.*, 1994), ou ainda, por meio de NO_3^- ou NO_2^-, na presença de um agente redutor, como o ascorbato (Klepper, 1990; Yamasaki *et al.*, 1999). Porém, como este tipo de reação direta requer a forma ácida não-dissociada do nitrato e/ou nitrito, a produção química de NO é desprezível em valores de pH acima de 4 (Yamasaki *et al.*, 1999).

Acredita-se que em pH fisiológico, a produção de NO só ocorra através de via enzimática pela ação da nitrato redutase (NR), como um produto secundário do metabolismo de nitrogênio (Dean e Harper, 1988; Klepper, 1990; Yamasaki *et al.*, 2000), ou através de uma enzima com características similares à NOS de mamíferos.

Ações do NO em plantas

Independentemente do mecanismo pelo qual o NO é produzido pelos vegetais, evidências recentes têm sugerido uma função sinalizadora desta molécula no crescimento e desenvolvimento e nas respostas de defesa de plantas ao ataque de patógenos. Óxido nítrico exógeno foi capaz de induzir a expansão foliar e o crescimento de raízes (Leshem, 1996; Gouvêa *et al.*, 1997) bem como a produção de fitoalexinas (Noritake *et al.*, 1996) e a reação de hipersensibilidade (RH) (Durner *et al.,* 1998; Delledonne *et al.*, 1998), processos relacionados com as respostas de plantas ao ataque de patógenos.

A administração de substâncias doadoras de NO ou a introdução de NOS de mamíferos em folhas ou células em suspensão de fumo induziram a expressão dos genes que codificam as proteínas relacionadas à patogênese (PR) e PAL, envolvidas no mecanismo de defesa das plantas (Durner *et al.*, 1998). Estes genes também foram induzidos por cGMP (GMP cíclico) e cADPR (ADP ribose cíclica), duas moléculas que servem como segundo mensageiros na sinalização do NO em mamíferos. Ainda, a ativação da expressão do gene *PAL* por NO foi suprimida por inibidores da enzima guanilato ciclase que, em mamíferos, é ativada pela ligação de NO ao seu grupamento heme ou pela *S*-nitrosilação de resíduos críticos de cisteína. A fragmentação do DNA,

um indicativo de morte celular programada observada na RH, tem sido induzida por NO exógeno em diferentes células vegetais (Pedroso *et al.*, 2000; Saviani *et al.*, 2001). Ainda, proteínas-alvo do NO em animais, como aconitase e quinases ativadas por mitógeno mostraram ser moduladas por NO em vegetais (Navarre *et al.*, 2000; Klessig *et al.*, 2000). Estes resultados vêm sugerindo que, pelo menos em alguns pontos, as vias de sinalização do NO em plantas e animais são comuns.

A NOS de vegetais

Evidências da existência de uma enzima do tipo NOS de mamíferos em plantas foram observadas pela primeira vez em 1996 (Ninnemann e Maier; Cueto *et al.*). Atividade NOS foi encontrada em raízes e nódulos de plantas leguminosas, sendo sua indução atribuída à presença de lipopolissacarídeos de *Rhizobium* (Cueto *et al.*, 1996). Posteriormente, foi sugerido que o NO derivado da atividade de uma enzima do tipo NOS estaria envolvido no estabelecimento da simbiose e como mediador na fixação de nitrogênio ao se ligar ao grupamento heme de centros redox da leghemoglobina (Mathieu *et al.*, 1998).

Utilizando anticorpos produzidos contra NOS de mamíferos, marcados com o indicador fluorescente isotiocianato de fluoresceína, Ribeiro *et al.* (1999) localizaram imunorreatividade para NOS em pontas de raízes de milho. Foi mostrado que a proteína NOS-imunorreativa de milho está presente no citoplasma de células na zona de divisão e é translocada para o núcleo em células na zona de alongamento de ponta de raízes. Estes resultados sugeriram que a localização dessa proteína, em milho, é dependente da fase de crescimento celular e que uma enzima do tipo NOS estaria envolvida na via

de transdução de sinais que controla o crescimento e o desenvolvimento de raízes. Estes resultados corroboraram os obtidos por Gouvêa *et al.* (1997) onde foi observado estímulo do alongamento das pontas de raízes de milho quando estas eram expostas a concentrações fisiológicas de liberadores de NO.

A NOS no mecanismo de resistência a fitopatógenos

Quando plantas são atacadas por determinado patógeno, para o qual apresentam resistência, estas podem desenvolver uma reação de hipersensibilidade (RH), que é caracterizada pelo desenvolvimento de lesão local do tecido vegetal que restringe o crescimento e proliferação do invasor. A RH está associada à indução de genes relacionados à defesa que também desempenham papéis importantes na contenção do patógeno, seja diretamente, levando à síntese de enzimas e metabólitos secundários com atividades antimicrobianas, ou indiretamente, ajudando a reforçar as paredes celulares das plantas (Brisson *et al.*, 1994; Baker e Orlandi, 1995; Low e Merida, 1996). As fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular com atividade antimicrobiana estão entre os principais metabólitos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque de microrganismos (Paxton, 1981; Kuć, 1995).

A participação de uma enzima tipo NOS nos mecanismos de defesa de plantas ao ataque de patógenos foi primeiramente descrita em 1998 (Delledonne, *et al.*; Durner *et al.*). Foi demonstrado que o NO, produzido endogenamente por uma enzima tipo NOS, potencializou a ação de intermediários reativos de oxigênio na indução de morte celular por hipersensibilidade, em células de soja em cultura (Delledonne *et al.*, 1998). O NO foi também capaz de induzir, independentemente das espécies reativas de

oxigênio, a expressão de genes envolvidos na síntese de fitoalexinas. Inibidores da NOS comprometeram a resposta de folhas de *Arabidopsis thaliana* ao ataque de *Pseudomonas syringae*, permitindo o crescimento da bactéria e o desenvolvimento da doença. Ainda, a inoculação de folhas de fumo com o vírus do mosaico do fumo induziu uma atividade tipo NOS no material resistente, mas não no suscetível (Delledonne *et al.*, 1998). Níveis aumentados de atividade NOS foram também observados em plantas de fumo resistentes à infecção por *Ralstonia solanacearum* (Huang e Knopp, 1998).

Embora em plantas, o gene para a NOS não tenha ainda sido descrito, uma seqüência de DNA com similaridade para NOS de *Rattus norvegicus* foi identificada no cromossomo 4 de *Arabidopsis thaliana* (Mayer *et al.*, 1999). Esta observação, juntamente com as crescentes descrições de atividade NOS em plantas, vêm sugerindo que uma enzima do tipo NOS constituiria um componente importante no mecanismo de resistência de plantas ao ataque de patógenos.

A via dos fenilpropanóides

As gliceolinas, pterocarpanos derivados da via dos fenilpropanóides, são as principais fitoalexinas produzidas pela soja. A fenilalanina amônia liase (PAL) é a primeira enzima desta via catalisando a desaminação não-oxidativa do aminoácido fenilalanina para a formação da primeira estrutura da rota biossintética com esqueleto fenilpropano, o ácido cinâmico (Strack, 1997). A hidroxilação este composto, pela ação da enzima ácido cinâmico 4-hidroxilase (CA4H) origina o ácido ρ-coumárico que, ativado por coenzima-A (CoA) via 4-coumarato coenzima A ligase (4CL), pode sofrer

reação de condensação com três equivalentes de malonil CoA. Como resultado poderão ser formados vários flavonóides (esqueleto $C_6C_3C_6$), entre eles flavanonas, flavonas, pterocarpanos e antocianinas, todos derivados do esqueleto fenilpropano (C_6C_3).

O produto de condensação, quando sob ação conjunta das enzimas chalcona sintase (CHS) e chalcona redutase (CHR) com oxidação de NADPH, gera daidzeína, uma isoflavona di-hidroxilada precursora da produção de gliceolinas. Inicialmente, uma chalcona tri-hidroxilada (naringenina) é formada (Welle e Grisebach, 1989) e, por ação da enzima chalcona isomerase (CHI) é convertida à flavanona correspondente e posteriormente a daidzeína, sob a ação da enzima isoflavona sintase (IFS). A daidzeína, através de sucessivas reações complexas, com o envolvimento de muitas enzimas é convertida em glicinol (3-6a-9 trihidroxipterocarpano) e este, através de prenilação e ciclização, nesta ordem, finalmente origina as gliceolinas, sendo os isômeros I, II e III os mais comumente encontrados (Bailey e Mansfield, 1982).

Caso o produto de condensação sofra a ação apenas da enzima chalcona sintase, forma-se a flavanona correspondente, que é um intermediário-chave tanto para a biossíntese de genisteína (isoflavona tri-hidroxilada) quanto de apigenina e luteolina (flavonas) e ainda antocianinas e 3-deoxiantocianinas (Figura 2). De imediato, uma chalcona tetra-hidroxilada é formada a partir do produto de condensação, em seguida convertida a genisteína por atividade isoflavona sintase ou às flavonas já citadas pela ação das enzimas flavonas sintase I e II. Ambas as ramificações - a partir do produto de condensação do ácido ρ-coumárico CoA com malonil CoA - podem ocorrer simultaneamente ou independentemente, conforme o estímulo.

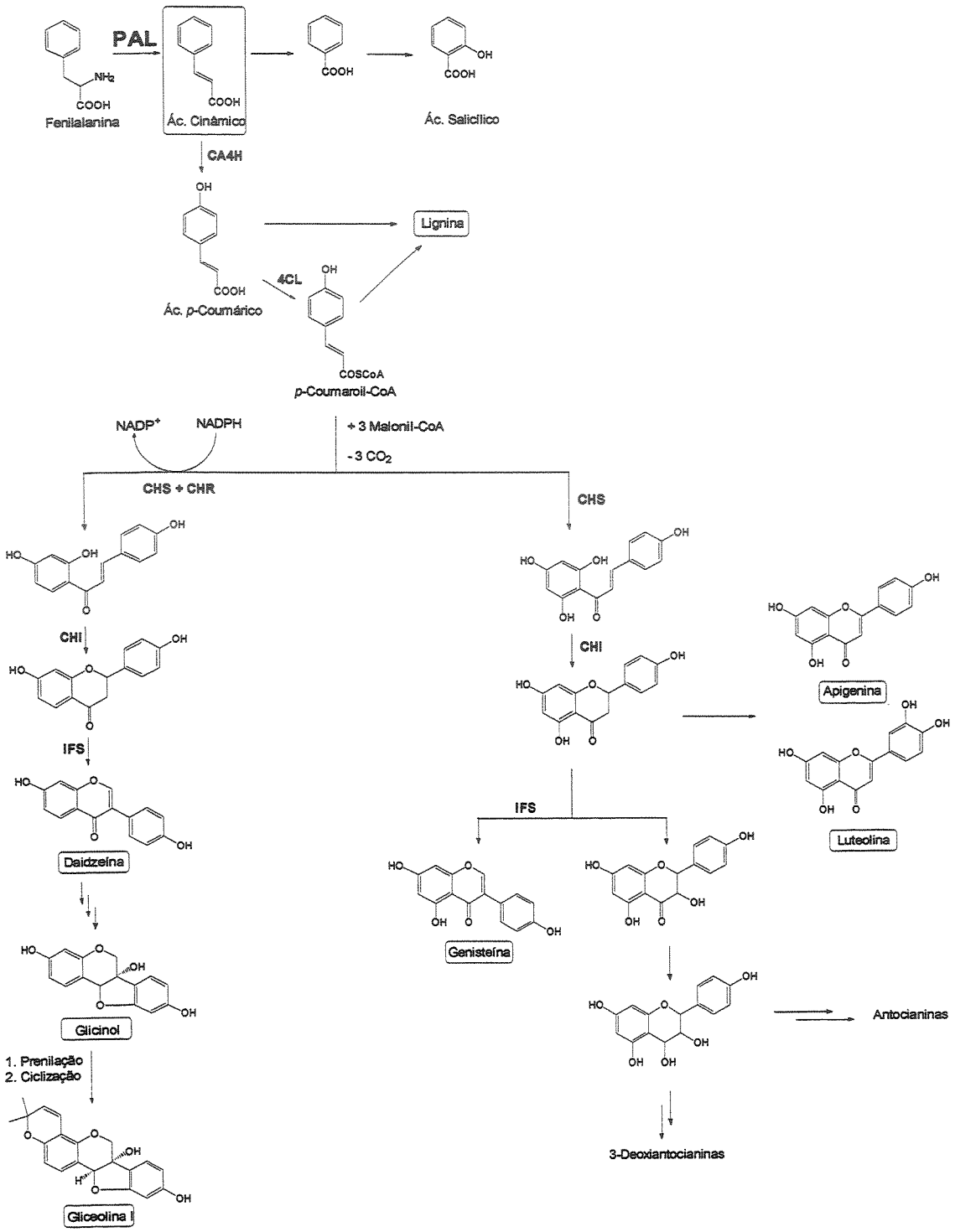

Figura 2: Rota biossintética da via dos fenilpropanóides e seus derivados flavonoídicos (Dixon e Paiva, 1995). **CA4H**, ácido cinâmico 4-hidroxilase; **4CL**, 4-coumarato:coenzima A ligase; **CHS**, **CHR** e **CHI**, chalcona sintase, redutase e isomerase, respectivamente; **IFS**, isoflavona sintase.

A eliciação de tecidos de soja por diferentes fatores bióticos ou abióticos pode ser acompanhada do aparecimento de uma intensa coloração avermelhada no ponto de eliciação. Sabe-se que a intensidade desta coloração é proporcional ao conteúdo de gliceolinas produzidas, uma vez que, tal coloração é derivada da presença de alguns pterocarpanos precursores destas fitoalexinas. Os precursores das gliceolinas que apresentam coloração avermelhada incluem os derivados do 3,6a,9-trihidroxipterocarpano (glicinol) e os compostos isoprenilados 4-dimetilalil-3,6a,9-trihidroxipterocarpano (gliceolidina I) e 2-dimetilalil-3,6a,9-trihidroxipterocarpano (gliceolidina II) (Zähringer *et al.*, 1981; Ingham *et al.*, 1981).

O cancro da haste da soja

A soja é uma cultura de origem asiática que se difundiu pela Europa e posteriormente pela América. As condições climáticas permitiram fácil adaptação desta cultura no Brasil.

As primeiras referências sobre o cultivo em São Paulo datam de 1892 e foram realizadas pelo Dr. Franz Wilhelm Daffert, no Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

A soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo estando em quarto lugar entre os grãos mais produzidos, perdendo apenas para o milho, o trigo e o arroz. Os Estados Unidos detêm a maior produção no contexto mundial e o Brasil ocupa o segundo lugar (USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos; www.usda.gov).

Entretanto, o cancro da haste, doença caracterizada por escuras lesões na haste, clorose e necrose das folhas, cujo agente etiológico é o fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* pode promover significantes perdas nesta cultura (Tyler,

1996). Identificado pela primeira vez na safra 1988/89, no sul do estado do Paraná e em área restrita no Mato Grosso (EMBRAPA, 1989), o cancro da haste da soja, na safra seguinte foi encontrado em todas as regiões produtoras de soja do país. Hoje, constitui-se num dos principais problemas para o cultivo desta leguminosa no Brasil, caracterizado principalmente pela grande quebra na produção de grãos (Krzyzanowski *et al.*, 1992). Uma vez introduzido na lavoura através de sementes e de resíduos contaminados em máquinas e implementos agrícolas, o fungo multiplica-se nas primeiras plantas infectadas e posteriormente, durante a entressafra, nos restos de cultura. Iniciando com poucas plantas infectadas no primeiro ano, o cancro da haste pode causar perda total na safra seguinte. O fungo é altamente dependente das chuvas para disseminar os esporos dos restos de cultura para as plântulas em desenvolvimento. Além das condições climáticas, os níveis de danos causados à soja dependem da suscetibilidade, do ciclo do cultivar e do momento em que ocorrer a infecção. Como o cancro da haste é uma doença de desenvolvimento lento (demora de 50 a 80 dias para matar a planta), quanto mais cedo ocorrer a infecção e quanto mais longo for o ciclo do cultivar, maiores serão os danos. Nos cultivares mais suscetíveis, o desenvolvimento da doença é mais rápido, podendo causar perda total (Yorinori, 1996). Sendo assim, é de grande interesse encontrar uma forma de minimizar tais perdas decorrentes do ataque deste patógeno.

Cultivares de soja obtidos através de melhoramento genético apresentam diferentes graus de resistência a esta doença quando analisados em campo. Assim, os cultivares IAC-14 e IAC-15 são suscetíveis; o cultivar IAC-15.1 apresenta um grau de resistência intermediário e os cultivares IAC-15.2 e IAC-18 são considerados resistentes (comunicação pessoal, Nelson R. Braga, Centro de Plantas Graníferas-IAC). As

alterações metabólicas que conferem as características de resistência destes cultivares ao cancro da haste não são conhecidas. Resultados de campo, obtidos no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), mostram que plantas resistentes de soja desenvolvem uma coloração avermelhada na haste após inoculação com fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (comunicação pessoal, Nelson R. Braga, Centro de Plantas Graníferas-IAC), um indicativo do acúmulo de fitoalexinas. Estas observações e as recentes descobertas de que o NO é capaz de ativar a expressão da PAL (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998) sugerem que uma enzima do tipo NOS poderia fazer parte do mecanismo de defesa de soja ao ataque do *Diaporthe*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a participação de uma enzima do tipo NOS na síntese de flavonóides, como parte do mecanismo de defesa de soja ao ataque do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, causador da doença do cancro da haste. Para atingir tais objetivos, as seguintes metas foram propostas:

- Estudar a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja dos cultivares IAC-14 (suscetível) e IAC-18 (resistente) quando tratados com uma solução eliciadora obtida a partir do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm);
- Verificar se o nitroprussiato de sódio (SNP), um composto liberador de NO é capaz de induzir a produção de fitoalexinas;
- Avaliar se a produção de fitoalexinas é diferenciada em função da suscetibilidade da soja ao fungo Dpm;
- Avaliar o efeito de inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na produção de fitoalexinas;
- Identificar os flavonóides induzidos em resposta ao Dpm e ao SNP;
- Correlacionar a indução de síntese de flavonóides com a atividade NOS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] dos cultivares IAC-14 e IAC-18, suscetíveis e resistentes ao fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. f. sp. *meridionalis* (Dpm), respectivamente, foram cultivadas em vermiculita e mantidas em casa de vegetação. Os cotilédones de plântulas de soja com 7 a 8 dias de idade foram retirados e utilizados na condução dos experimentos. As sementes foram gentilmente cedidas pelo Dr. Nelson Raimundo Braga do Centro de Plantas Graníferas do Instituto Agronômico de Campinas.

3.2. Preparo da solução eliciadora do fungo Dpm

A eliciação dos cotilédones foi realizada com nitroprussiato de sódio (SNP) ou com extrato derivado de esporos do fungo Dpm, o agente etiológico do cancro da haste. Cepas do fungo Dpm foram gentilmente cedidas pela Dra. Margarida Fumiko Ito do Centro de Fitossanidade do Instituto Agronômico de Campinas.

A cultura foi mantida em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e após 20-30 dias, período suficiente para a ocorrência de esporulação, foi repicada para placas de Petri contendo 20 mL do meio indicado, para manutenção. Não mais que cinco processos de repicagem foram feitos, para se evitar a perda gradativa da patogenicidade do fungo em questão.

Os esporos produzidos no período de 20-30 dias foram extraídos por adição de aproximadamente 5 mL de água destilada a cada placa. A suspensão foi filtrada em peneira de nylon de 45 μm, autoclavada por 30 minutos e centrifugada a 1.000 x *g* por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado como solução eliciadora. Os carboidratos presentes no sobrenadante (extrato de Dpm) foram quantificados em equivalentes de glicose por volume de solução, pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956), com algumas modificações, tendo glicose como padrão. Medidas espectrofotométricas (Espectrofotômetro Beckman DU 640) foram realizadas a 490 nm.

3.3. Eliciação de cotilédones de soja com extrato de Dpm e SNP

Os cotilédones de plântulas de soja com 7 a 8 dias de idade foram coletados e imersos em água destilada de modo a não desidratarem. Estes foram lavados abundantemente com água deionizada autoclavada e mantidos em câmara de fluxo laminar horizontal onde se conduziu todo o experimento assepticamente.

A metodologia adotada foi a de Ayers *et al.* (1976a) onde um corte superficial de 1,0 cm de diâmetro foi realizado no centro da região adaxial de cada cotilédone, com o auxílio de um furador de rolha. Com um bisturi, retirou-se desta região apenas a epiderme e uma porção das células do mesofilo, deixando-se uma pequena depressão no formato de um cálice. Em cada placa de Petri, contendo papel de filtro embebido com 3 mL de água deionizada, foram acondicionados de 5 a 6 cotilédones com os cortes voltados para cima. Em cada cotilédone, uma gota de 50 μL de solução

eliciadora foi aplicada na região do corte. Devido à depressão em formato de cálice que é realizada na referida região, esta gota permanece durante todo o período de eliciação. Para a eliciação utilizou-se extrato de Dpm nas concentrações que variaram de 1 a 13 μg de equivalentes de glicose e SNP a 1; 5 e 10 mM. Todas as placas foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz uma vez que, compostos liberadores de NO são fotossensíveis (Shishido, 1998; Shishido e De Oliveira, 2000).

Ao final do tratamento, que variou de 3 a 20 h, cada cotilédone foi lavado com 1 mL de água deionizada de forma a coletar o exudato depositado na gota eliciadora. Medidas espectrofotométricas destas soluções foram determinadas a 286 e 489 nm para se estimar a produção de fitoalexinas.

3.4. Eliciação de cotilédones de soja pré-tratados com inibidores da NOS de origem animal

A metodologia utilizada para estes ensaios foi semelhante à descrita no item 3.3, com exceção de que, anteriormente à exposição dos cotilédones aos eliciadores, estes foram embebidos com soluções de inibidores da NOS conforme mostra o esquema da Figura 3.

Os inibidores utilizados, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e aminoguanidina (AMG), foram preparados na concentração de 3 mM em água deionizada ou em tampão MES [ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico] a 50 mM, pH 5,8. Experimentos empregando solução de AMG e L-NAME sob tamponamento foram

realizados uma vez que este último composto, quando em solução aquosa, torna o meio ácido (pH em torno de 3,0) podendo causar estresse ao tecido vegetal.

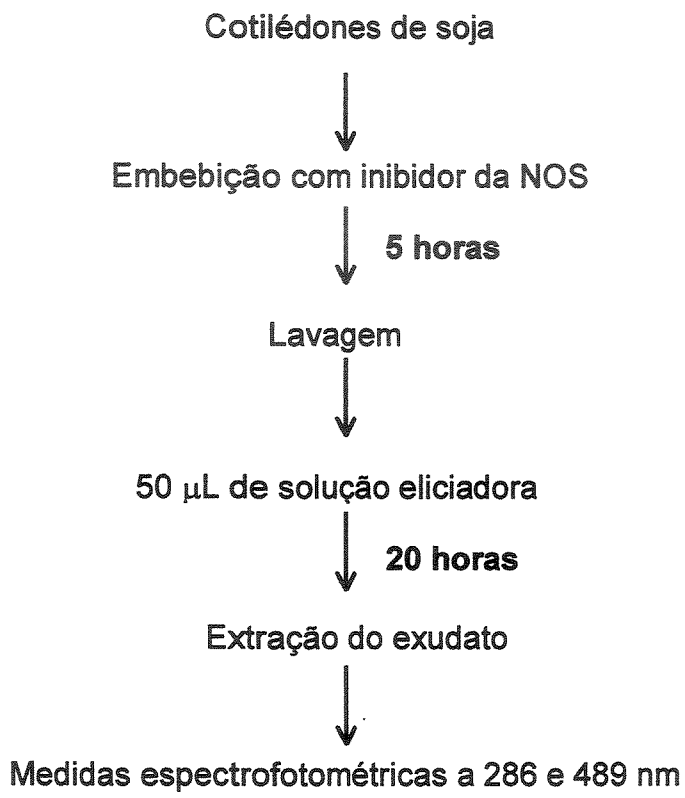

Figura 3: Representação esquemática da metodologia empregada para analisar o efeito de inibidores da NOS na produção de fitoalexinas em cotilédones de soja.

3.5. Identificação de flavonóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.5.1. Preparo das amostras

Após a realização de medidas espectrofotométricas os exudatos oriundos dos tratamentos com Dpm, SNP ou água foram preparados para serem cromatografados em CLAE. As amostras foram divididas em dois grupos, cada um contendo exudatos oriundos de 20 cotilédones eliciados. Em cada amostra pertencente ao primeiro grupo foram realizadas duas extrações líquido-líquido com acetato de etila bi-destilado na proporção de 1:1 (Keen, *et al.*, 1978). As frações orgânicas foram recolhidas, secas, ressuspensas em metanol grau CLAE e cromatografadas para identificação de daidzeína, genisteína e gliceolinas. Cada amostra do segundo grupo foi evaporada até a secura e diretamente ressuspensa em metanol grau CLAE seguindo a cromatografia para identificação de apigenina e luteolina. Padrões autênticos de daidzeína, genisteína, apigenina e luteolina (Sigma) foram utilizados para identificar os metabólitos presentes na amostra. Exudatos de cotilédones de soja cv. Williams da Illinois Foundation Seeds, gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Michael G. Hahn, University of Georgia – USA foram usados como padrão de gliceolinas uma vez que estas não são encontradas comercialmente.

3.5.2. Processo cromatográfico

As amostras do primeiro grupo foram analisadas em cromatógrafo Dionex DX500 com detector de arranjo de diodo através de uma coluna Zorbax ODS C-18 de 0,46 x 25,00 cm em um gradiente linear de 20 a 60% de acetonitrila em TFA a 0,1% (0,7 mL/min) segundo metodologia descrita por Pelicice *et al.* (2000). Foi feita uma curva padrão variando-se a concentração de cada composto comercial puro e analisando-se a 286 nm a área do pico correspondente a cada substância.

Para as amostras do segundo grupo, a análise foi conduzida em cromatógrafo Shimadzu com detector UV-visível Shimadzu SPD-10AV através de uma coluna Shimadzu CLS ODS C-18 de 0,46 x 25,00 cm em um gradiente linear começando com metanol 50% em ácido fórmico 10%, aumentando para 80% em 10 minutos, seguindo aumento para metanol 100% durante 3 minutos e retornando a metanol 50% em 2 min mantendo esta concentração por mais 2 min para lavagem da coluna (fluxo de 1 mL/min). Esta metodologia é uma modificação daquela descrita por García-Viguera *et al.* (1998). Curva padrão para cada substância em questão foi realizada variando-se a concentração do composto comercial puro e analisando a área do pico correspondente a 336 e 350 nm, para apigenina e luteolina, respectivamente.

3.6. Medida da atividade NOS

Atividade NOS em tecidos de cotilédones de soja eliciados com Dpm ou SNP em diferentes tempos foi determinada pelo método de ensaio da citrulina de acordo com Rees *et al.* (1995), com algumas modificações. Tecidos de soja (0,5 a 1,0 g) foram

homogeneizados em 0,5 a 1,0 mL de tampão de extração gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; sacarose 320 mM; leupeptina 10 μg/mL; inibidor de tripsina de soja 10 μg/mL; aprotinina 2 μg/mL; PMSF 1 mM; DTT 10 mM; glutationa reduzida 10 mM) e 0,050 mg de PVPP/g de tecido, utilizando sistema de dispersão e mistura Polytron Kinematica AG. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. A quarenta microlitros do sobrenadante resultante foram adicionados 100 μL de tampão de ensaio [HEPES 40 mM, pH 7,2; FAD 10 μM; FMN 10 μM; DTT 1 mM; $CaCl_2$ 1,25 mM; BH_4 50 μM; CaM 10 μg/mL; β-NADPH 1 mM e L-[U-^{14}C] arginina 1 μM (0,05 μCi) ou L-[U-^{14}C] arginina 2 μM (0,10 μCi)] acrescido de L-arginina não radioativa a 8 μM. Seguindo incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma suspensão de Dowex-Ag50W (200-400, 8% carregada com Na^+) em tampão HEPES 100 mM/EDTA 10 mM, pH 5,5 (proporção de 1:1,5). A resina foi removida centrifugando o sistema a 10.000 x *g* por 10 minutos a 18 °C. Foram adicionados 3 mL de líquido de cintilação a 400 μL do sobrenadante resultante e a amostra foi analisada em contador de cintilação (Beckman LS 6000). A eficiência da resina na adsorção de L-[U-^{14}C] arginina foi averiguada em reação conduzida na ausência de amostras e também em reação sem a adição de Dowex.

A atividade NOS nas amostras foi determinada pela conversão de L-[U-^{14}C] arginina a L-[U-^{14}C] citrulina na ausência ou na presença de inibidores específicos da NOS de origem animal (L-NAME, AMG e L-NIL a 3 mM). Foi considerada atividade NOS a resultante da diferença entre estes dois tratamentos. A dosagem de proteína nas amostras foi realizada através do método de ligação com *Coomassie blue* utilizando o reagente de determinação de proteína (Bio Rad) e BSA como padrão (Bradford, 1976).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4. RESULTADOS

4.1. Estabelecimento de parâmetros para a eliciação de cotilédones de soja com o extrato do fungo Dpm

O estudo da ativação da síntese de flavonóides na interação soja-Dpm e da participação da enzima NOS nesta resposta foram realizados utilizando-se o método de eliciação em cotilédones.

Ensaios preliminares foram desenvolvidos para se estabelecer a concentração ideal a ser utilizada na eliciação dos cotilédones de soja com o extrato do fungo Dpm. Os cotilédones foram tratados com quantidades do extrato que variaram de 1,0 a 13,0 μg em equivalentes de glicose, aplicados em gotas de 50 μL sobre cada cotilédone. A curva dose-resposta mostrou que o incremento na produção de fitoalexinas foi proporcional ao aumento de concentração do eliciador (Figura 4). Significativa produção de fitoalexinas foi observada quando se utilizou extrato de Dpm a 13 μg/50 μL, concentração que foi adotada para a maioria dos ensaios.

O acúmulo de fitoalexinas nos cotilédones foi proporcional ao tempo de eliciação (Figura 5). Um tempo máximo de eliciação de 20 horas foi adotado uma vez que, após este período os cotilédones desidratavam ou tornavam-se oxidados na região do corte.

O espectro de absorção na região do ultravioleta-visível para os exudatos analisados apresentou dois comprimentos de onda de máxima absorção, λ = 286 nm e λ = 489 nm. Os valores de absorbância obtidos em 286 nm foram considerados como indicativo da presença de fitoalexinas, uma vez que, as gliceolinas e a maioria dos

isoflavonóides apresentam máxima absorção nesta região do espectro (Ingham, 1982). Os valores de absorbância no comprimento de onda de 489 nm foram também determinados durante os ensaios de eliciação, pois indicam a presença dos pterocarpanos, produtos de oxidação da daidzeína, intermediários na síntese de gliceolinas, o qual seu conteúdo é proporcional à produção destas fitoalexinas (Ayers *et al.*, 1976b). A Figura 6 apresenta uma imagem do ensaio de eliciação em cotilédones de soja, onde pode se observar a formação dos pigmentos vermelhos.

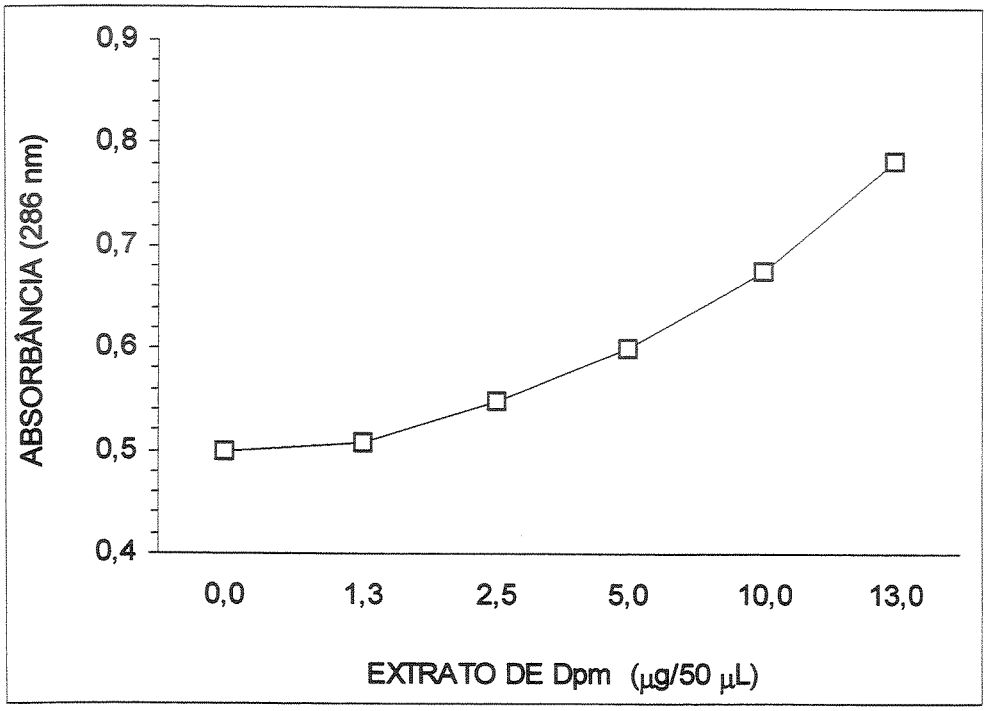

Figura 4: Curva dose-resposta para a eliciação de cotilédones de soja com o extrato do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm). Cotilédones do cultivar IAC-18 foram tratados com 50 μL de extrato de Dpm, nas concentrações indicadas, por 20 h. Após este período, os exudatos foram coletados e analisados a 286 nm para se estimar a produção de fitoalexinas.

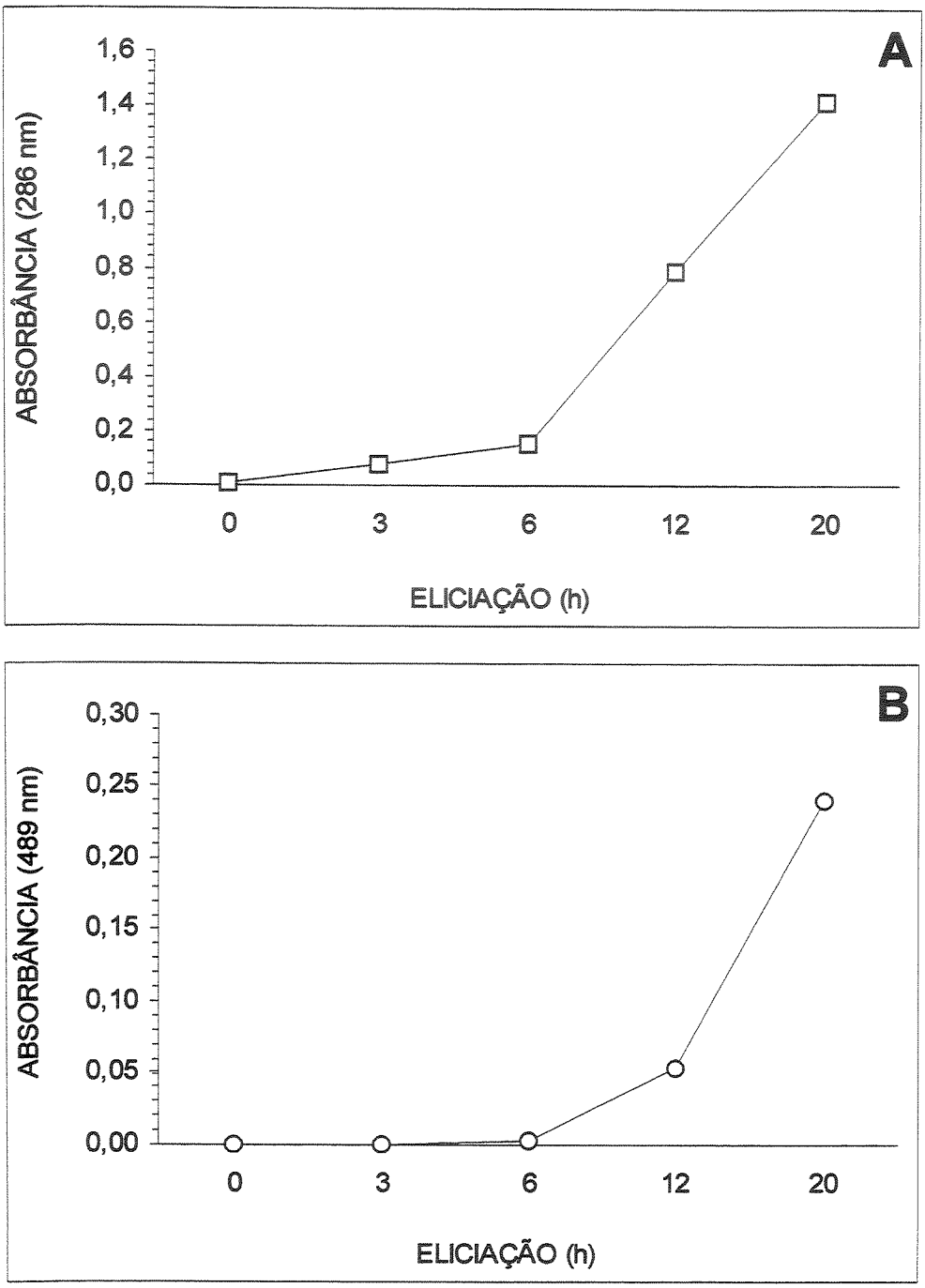

Figura 5: Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja em função do tempo de eliciação. Cotilédones de soja cv. IAC-18 foram tratados com extrato de Dpm (20 μg/50 μL) nos tempos de eliciação indicados. Após a incubação os exudatos foram analisados espectrofotometricamente a 286 e 489 nm para se estimar a produção de fitoalexinas **(A)** e pigmentos vermelhos **(B)**, respectivamente.

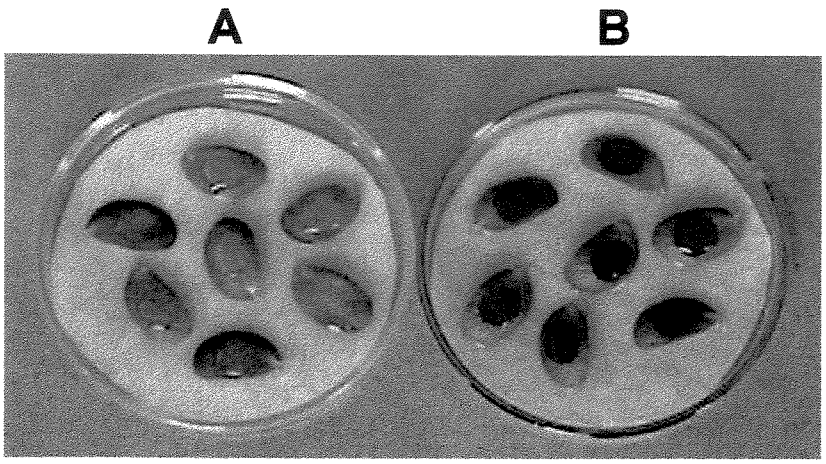

Figura 6: Imagem de cotilédones de soja tratados com água deionizada (A) ou extrato de Dpm (B). Cotilédones de plantas de 7 dias de idade do cv. IAC-18 foram eliciados com 50 μL de água deionizada ou extrato de Dpm (13 μg/50 μL) por um período de 20 horas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

4.2. Estímulo da produção de fitoalexinas em cotilédones de soja eliciados por SNP

Um estudo avaliando-se a eficiência do óxido nítrico na indução da produção de fitoalexinas em cotilédones de soja foi realizado utilizando-se nitroprussiato de sódio (SNP), um liberador inorgânico de NO. Nestes ensaios, os cotilédones foram também eliciados com extrato de Dpm de maneira a se comparar a resposta destes com aquela induzida por SNP. Ainda, foram feitos ensaios com os cvs. IAC-14 e IAC-18 para verificar a relação entre resistência e produção de fitoalexinas.

Como pode ser observado na Figura 7, o SNP atuou de maneira dose-dependente sendo que, na concentração de 10 mM as produções de fitoalexinas e dos pigmentos vermelhos foram equivalentes àquelas induzidas pelo extrato de Dpm.

Não foi observada diferença de resposta entre o cultivar resistente (IAC-18) e o cultivar suscetível (IAC-14) quando a produção de fitoalexinas pelos cotilédones foi estimada pela absorbância a 286 nm (Figura 7A). Por outro lado, a intensidade de coloração avermelhada foi mais acentuada no cultivar IAC-18 (Figura 7B). Estes resultados sugeriram que o cv. IAC-18 apresenta uma maior capacidade de produção de precursores de gliceolinas, o que estaria de acordo com as respostas observadas em campo no Instituto Agronômico de Campinas.

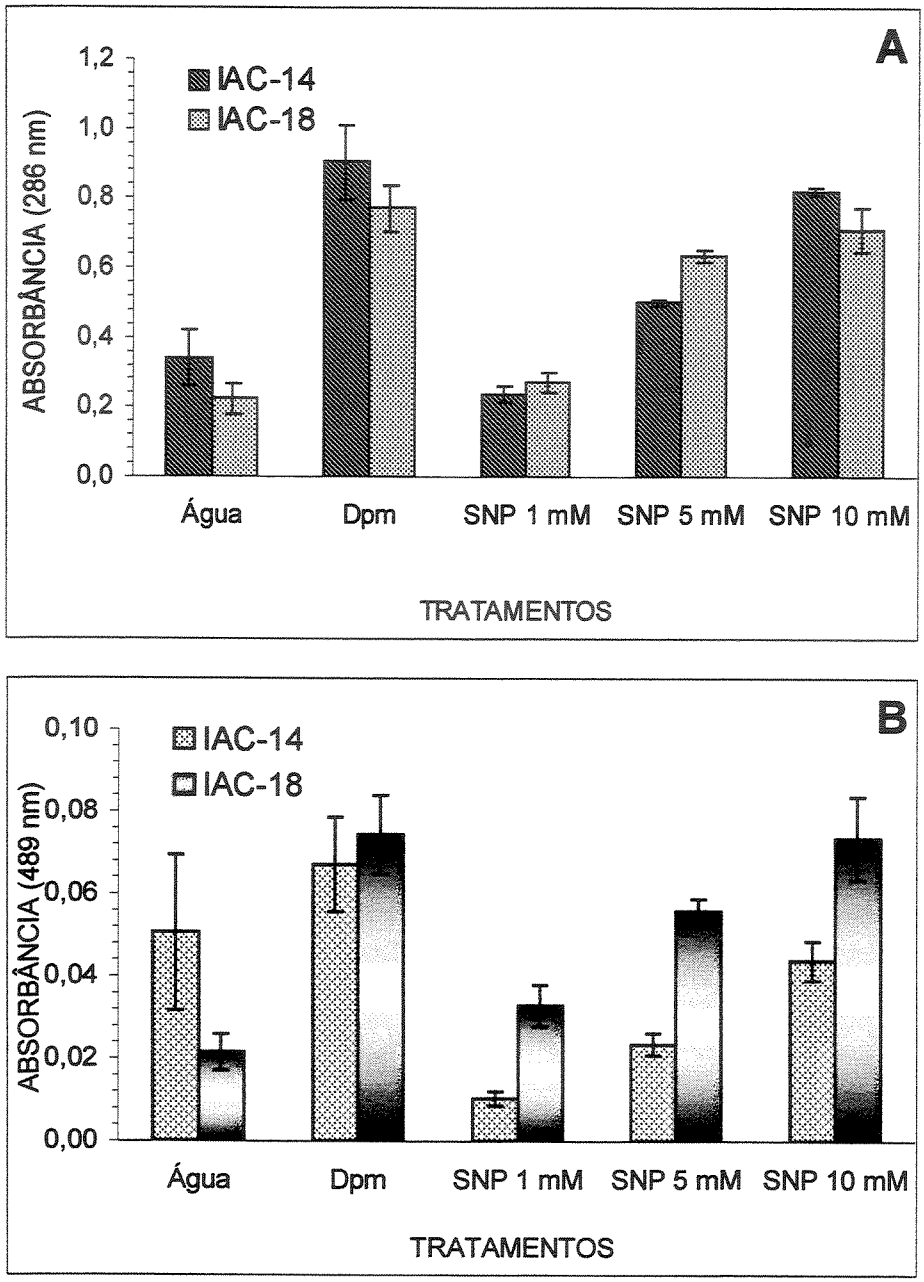

Figura 7: Indução dose-dependente do acúmulo de fitoalexinas por SNP em cotilédones de soja. Cotilédones dos cvs. IAC-14 e IAC-18 foram tratados com 50 μL de SNP nas concentrações indicadas. Após 20 horas determinou-se a produção de fitoalexinas (**A**) e pigmentos vermelhos (**B**). Nos controles, os cotilédones foram tratados com 50 μL de água ou extrato de Dpm (13 μg/50 μL). Cada barra representa a média ± EPM de 4 a 6 repetições.

4.3. Efeito de inibidores de NOS na produção de fitoalexinas

Admitindo-se que o NO possa participar no desencadeamento do estímulo da produção de fitoalexinas em plantas quando atacadas por um patógeno e que, esta molécula possa ser um produto de reação catalisada por uma enzima do tipo NOS, foi avaliado o efeito de inibidores da NOS de origem animal na resposta de cotilédones de soja a eliciação por Dpm. Estes ensaios foram inicialmente realizados apenas com o cv. IAC-18 para se verificar a eficiência do protocolo. Os cotilédones, quando pré-tratados com os inibidores da NOS, N^G-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e aminoguanidina (AMG) por 5 horas e, em seguida, incubados com o extrato de Dpm por 20 horas apresentaram os conteúdos de fitoalexinas e pigmentos avermelhados reduzidos quando comparados aos controles (Figura 8). Em termos de erro padrão da média (EPM) os resultados obtidos nos tratamentos água/Dpm e inibidor/Dpm diferem significativamente entre si, tanto em relação à estimativa de produção de fitoalexinas (Figura 8A) como de pigmentos vermelhos (Figura 8B).

O tratamento prévio de cotilédones de soja com inibidores de NOS visualmente causou a diminuição da intensidade da coloração avermelhada produzida em função da eliciação com extrato de Dpm.

Com o objetivo de se comparar o efeito de inibidores da NOS na eliciação dos cotilédones em função da resistência ao Dpm, um experimento foi realizado com os dois cultivares. Nestes ensaios o meio foi tamponado com MES, procurando-se evitar uma possível variação de pH durante a eliciação. Ainda, foi analisado também o efeito dos inibidores da NOS na eliciação dos cotilédones por SNP.

Como pode ser observado na Figura 9, os cotilédones, quando pré-tratados com os inibidores da NOS, L-NAME ou AMG, mostraram uma queda de quase 50% na produção de fitoalexinas não se observando diferença significativa de resposta entre os cultivares. Ainda, ministrando-se aos cotilédones solução de SNP (10 mM) após pré-tratamento destes com L-NAME ou AMG, não se observou efeito inibitório na produção de fitoalexinas.

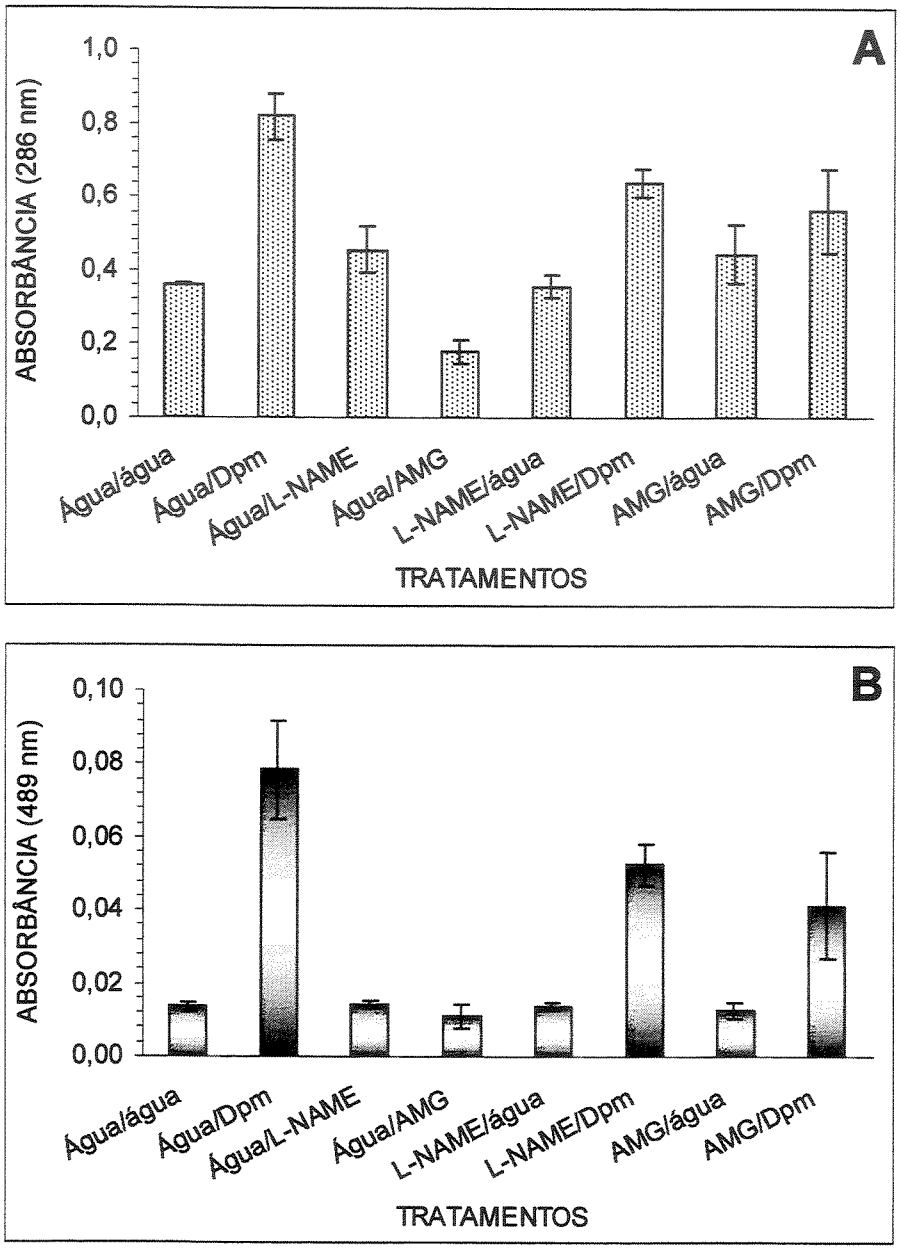

Figura 8: Efeito de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) na produção de fitoalexinas induzida por extrato de Dpm. Cotilédones de soja cv. IAC-18 foram pré-incubados (5 h) com água, L-NAME (3 mM) ou AMG (3 mM) e posteriormente tratados com 50 μL de extrato de Dpm (13 μg/50 μL), L-NAME (3 mM) ou AMG 3 mM, como indicado. Após 20 horas de tratamento, os exudatos foram analisados para se estimar a produção de fitoalexinas **(A)** e pigmentos vermelhos **(B)**, respectivamente.

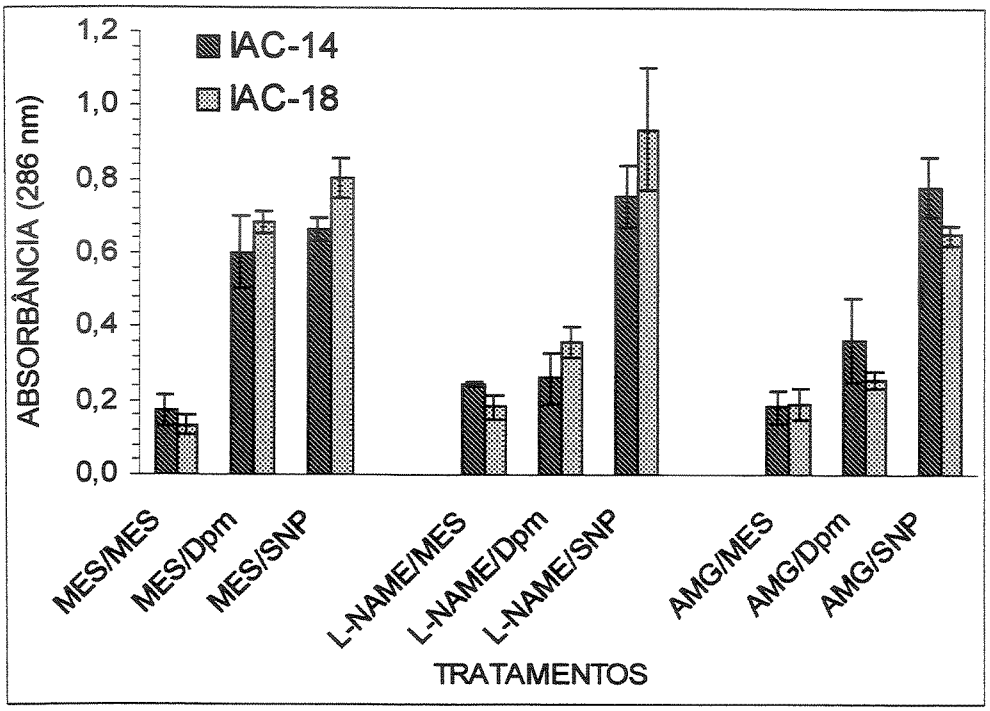

Figura 9: Efeito de inibidores da NOS na produção de fitoalexinas induzida por extrato de Dpm e SNP. Cotilédones de soja dos cvs. IAC-14 e IAC-18 foram pré-incubados (5 h) com tampão MES (50 mM), L-NAME (3 mM) ou AMG (3 mM) e posteriormente tratados com 50 μL de MES, extrato de Dpm (13 μg/50 μL) ou SNP (10 mM), como indicado. Após 20 horas de tratamento, os exudatos foram analisados para se estimar a produção de fitoalexinas.

4.4. Identificação, por CLAE, dos flavonóides produzidos em resposta à eliciação

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de se identificar algumas, senão as principais moléculas responsáveis pela absorbância observada a 286 nm nos exudatos extraídos dos cotilédones de soja eliciados com o extrato de Dpm ou com SNP. Utilizando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi determinado inicialmente o tempo de retenção dos padrões de gliceolinas (Gs), seu precursor daidzeína (Dz), e do isoflavonóide genisteína (Gt) (Figura 10). A partir destes controles foram analisadas as respostas dos cotilédones em função do tempo de eliciação.

Quando os cotilédones de soja foram eliciados com o extrato de Dpm, os isoflavonóides daidzeína e genisteína começaram a ser identificados após 6 horas de eliciação (Figura 11) enquanto que na eliciação com SNP o aparecimento destes metabólitos foi mais precoce, sendo já detectados após 3 horas (Figura 12). As gliceolinas, que correspondem aos pterocarpanos derivados do isoflavonóide daidzeína, tiveram sua presença detectada após 12 horas de eliciação com Dpm, produção que foi aumentada após 20 horas (Figura 11). Em relação a eliciação com SNP, após 12 horas, somente daidzeína e genisteína ainda eram detectadas, enquanto que as gliceolinas apareceram apenas após 20 horas de eliciação (Figura 12). No tempo de 20 horas outros metabólitos, não identificados, foram produzidos podendo-se observar que o extrato de Dpm induziu o acúmulo de uma maior variedade de metabólitos (Figura 11) em relação ao SNP (Figura 12).

Uma análise comparativa da produção de daidzeína, genisteína e gliceolinas nos cotilédones eliciados com extrato de Dpm ou SNP é apresentada na Figura 13. Como

pode ser observado, na eliciação por Dpm, a produção de daidzeína foi máxima com 12 horas, diminuindo após este tempo, quando a produção de gliceolinas começou a se elevar (Figura 13A). Esta alteração na proporção destes dois metabólitos deve representar uma conversão da daidzeína em gliceolinas nos tempos mais avançados de eliciação. Por outro lado, no caso da eliciação por SNP, embora a maior produção de daidzeína também tenha ocorrido após 12 horas, os níveis deste precursor pouco diminuíram após 20 horas de eliciação e ainda, a quantidade detectada de gliceolinas neste tempo foi bem menor do que aquela induzida por Dpm (Figura 13B).

A produção máxima de genisteína nos dois casos ocorreu com 12 horas de eliciação (Figura 13). Comparando-se as respostas dos cotilédones de soja aos eliciadores, pode-se observar que, a resposta ao SNP é mais rápida (a produção de daidzeína e genisteína já é detectada após 3 horas) e intensa (maior produção de daidzeína e genisteína) em relação a eliciação por Dpm. No entanto, a conversão da daidzeína em gliceolinas parece ser menos eficiente na eliciação por SNP (Figura 13B) em relação àquela induzida por Dpm (Figura 13A). A resposta precoce ao SNP apóia a proposta de que na eliciação por Dpm ocorreria a ativação de uma enzima do tipo NOS produzindo NO que atuaria como um ativador da síntese de fitoalexinas.

A Figura 14 mostra o perfil cromatográfico de exudatos extraídos de cotilédones de soja eliciados com SNP ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) ou ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$). Pode-se observar que o SNP foi muito mais eficiente em induzir a produção dos isoflavonóides genisteína e daidzeína do que o ferricianeto. Estes resultados fortalecem a proposta de que o óxido nítrico, liberado do SNP, seria a molécula sinalizadora responsável pela ativação da síntese de fitoalexinas.

Como mostrado na Figura 15, os exudatos de cotilédones eliciados com Dpm, apresentaram também um pico de absorbância na região de 340 nm. Algumas flavonas intermediárias da via dos fenilpropanóides como, apigenina e luteolina, apresentam absorbância nesta região do espectro (Bailey e Mansfield, 1982). Assim, os exudatos eliciados com Dpm e SNP foram também analisados para se detectar a presença destes compostos. A Figura 16 apresenta o perfil de eluição de padrões autênticos de apigenina e luteolina, cromatografados a 336 nm e 350 nm, respectivamente. A partir destes controles as amostras foram analisadas constatando-se que, a eliciação de cotilédones com extrato de Dpm induziu a produção de apigenina e luteolina (Figura 17A) enquanto que, somente luteolina foi induzida por SNP (Figura 17B). Ambos os eliciadores induziram uma máxima produção de luteolina após 12 horas, com uma queda em 20 horas. Entretanto, a resposta ao SNP foi precoce em relação ao Dpm, uma vez que, após 3 horas de eliciação a presença deste metabólito já era detectada. A produção de apigenina induzida por Dpm começou a ser detectada mais tardiamente, apenas após 12 horas, com um aumento em 20 horas (Figura 17A).

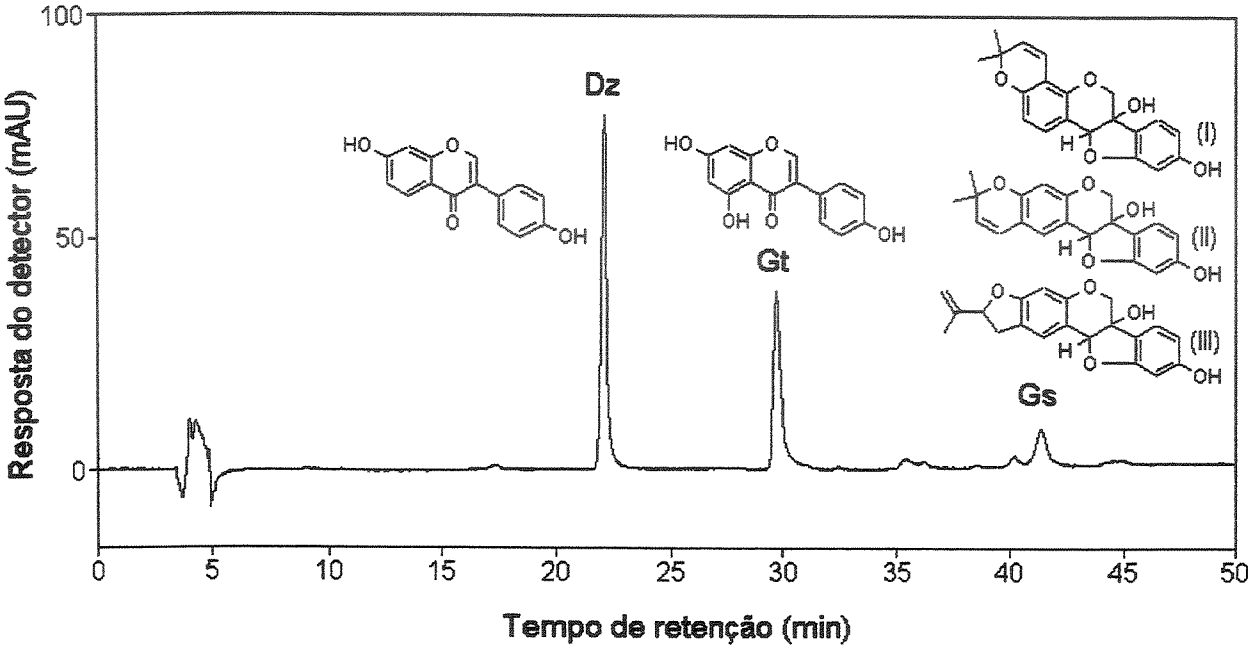

Figura 10: Perfil cromatográfico dos padrões de daidzeína, genisteína e gliceolinas. Padrões autênticos de daidzeína e genisteína, bem como, exudatos de cotilédones de soja cv. Williams, foram cromatografados simultaneamente por CLAE, a 286 nm. **Dz**, daidzeína; **Gt**, genisteína; **Gs**, gliceolinas.

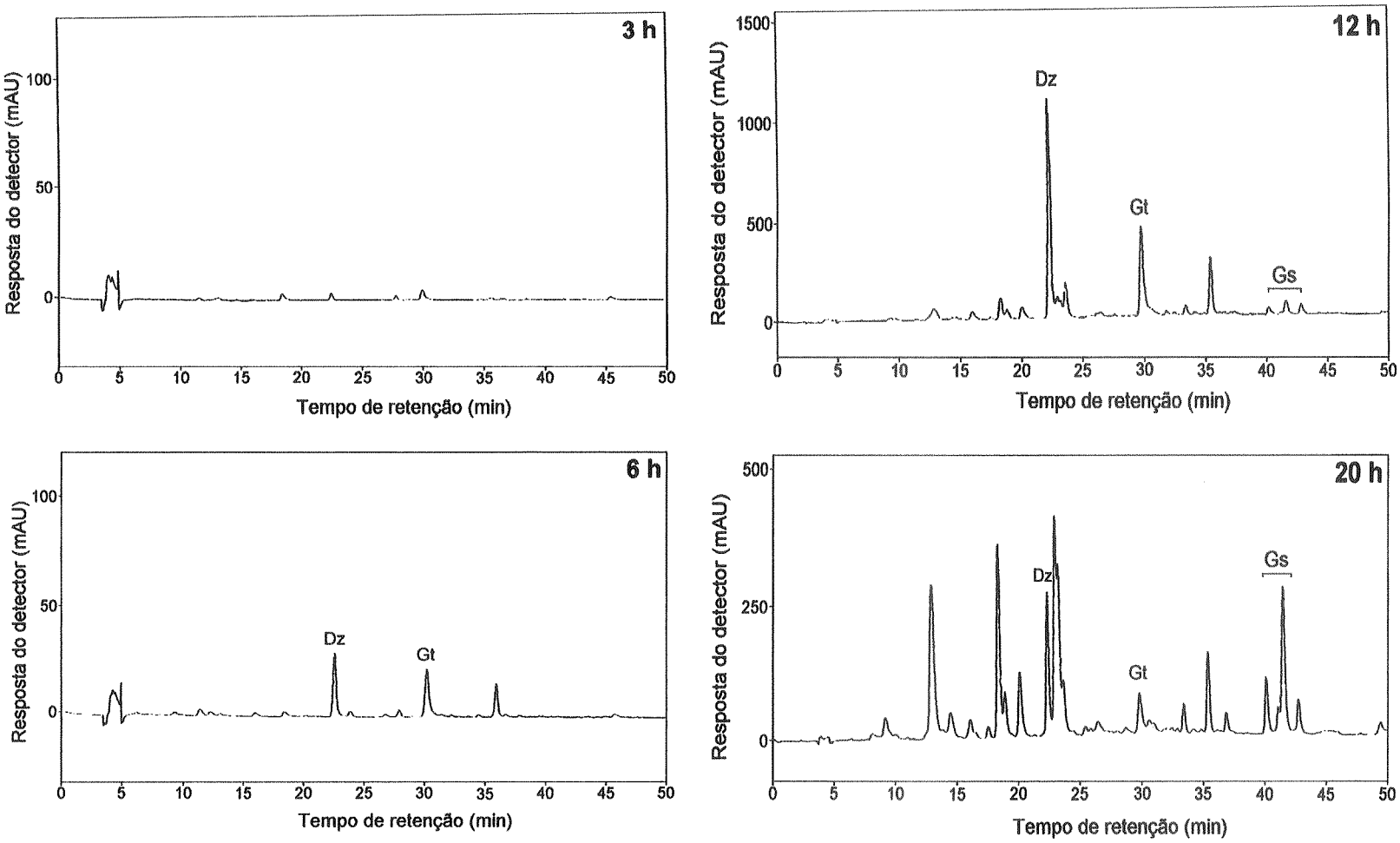

Figura 11: Identificação dos isoflavonóides e pterocarpanos produzidos por cotilédones de soja em resposta ao Dpm. Cotilédones do cv. IAC-18 foram eliciados com o extrato de Dpm (20 μg/50 μL). Alíquotas dos exudatos extraídos após os tempos de eliciação indicados foram cromatografadas por CLAE, a 286 nm. Os metabólitos foram identificados a partir do tempo de retenção dos padrões (Figura 10). **Dz**, daidzeína; **Gt**, genisteína; **Gs**, gliceolinas.

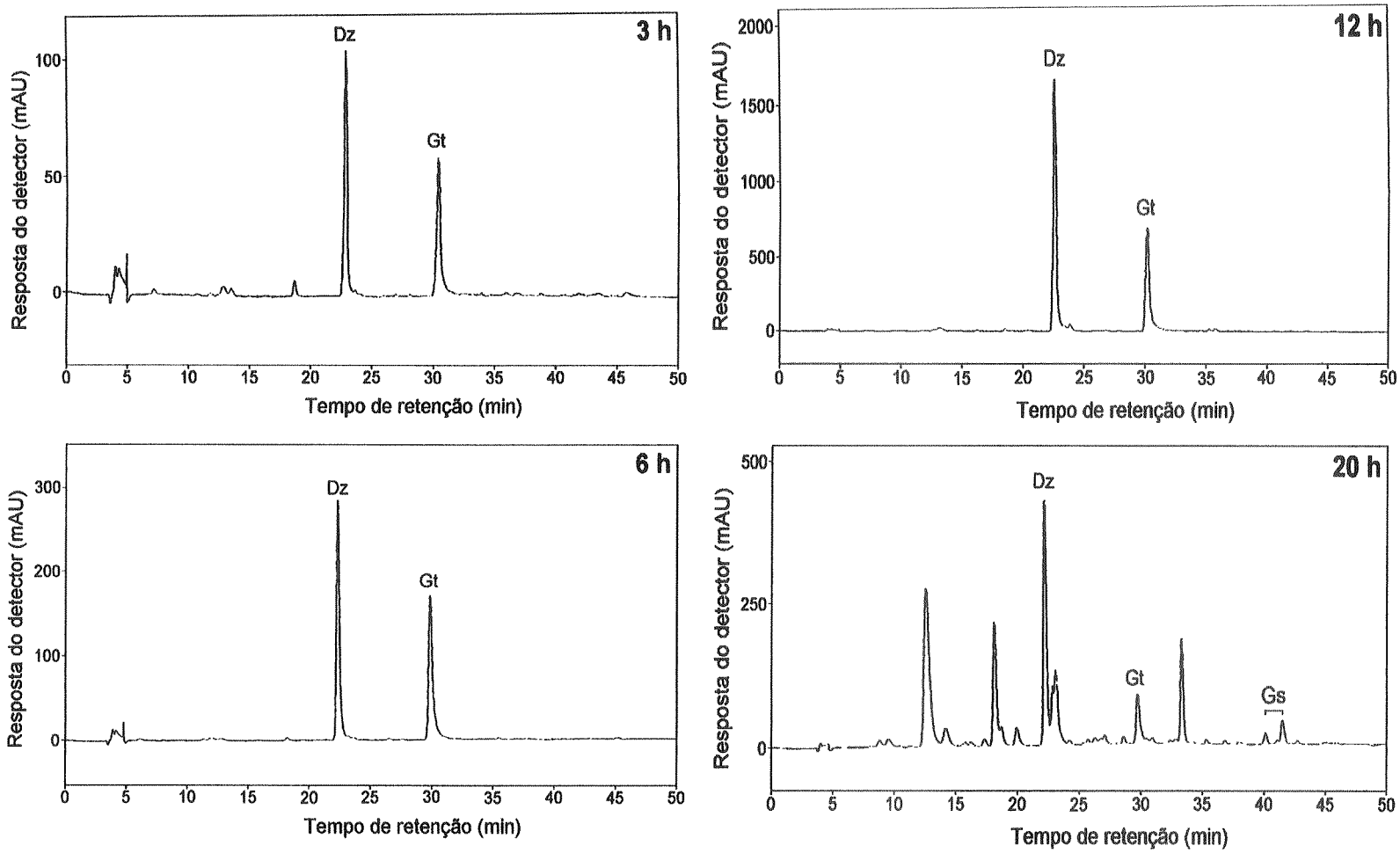

Figura 12: Identificação dos isoflavonóides e pterocarpanos produzidos por cotilédones de soja em resposta ao SNP. Cotilédones do cv. IAC-18 foram eliciados com SNP (10 mM). Alíquotas de exudatos extraídos após os tempos de eliciação indicados foram cromatografadas por CLAE, a 286 nm. Os metabólitos foram identificados a partir do tempo de retenção dos padrões (Figura 10). **Dz**, daidzeína; **Gt**, genisteína; **Gs**, gliceolinas.

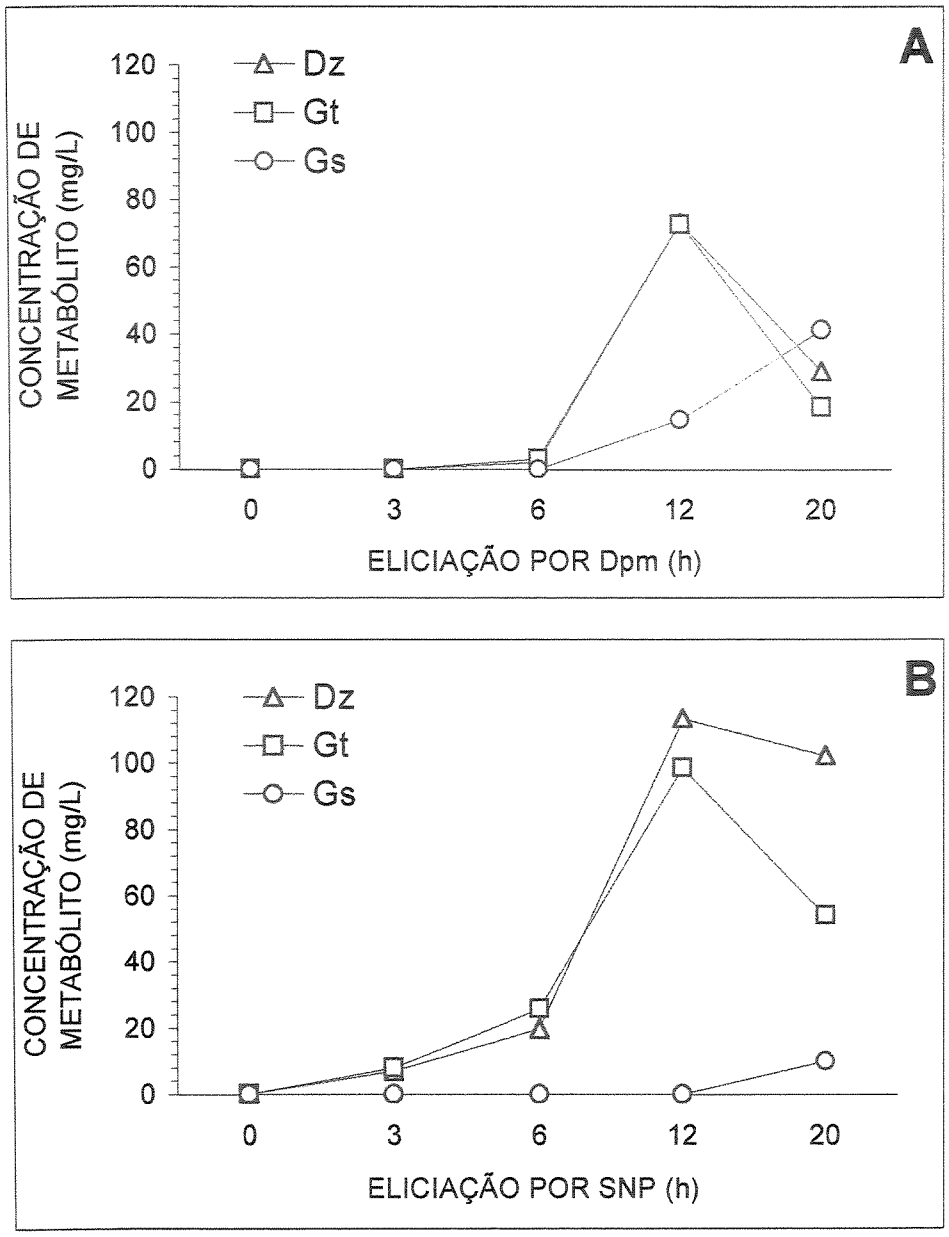

Figura 13: Quantificação dos isoflavonóides e pterocarpanos produzidos por cotilédones de soja cv. IAC-18 em resposta ao Dpm (A) e SNP (B). As concentrações dos metabólitos identificados em resposta ao Dpm (Figura 11) e ao SNP (Figura 12) foram determinadas a partir de curvas de concentração dos padrões de daidzeína **(Dz)**, genisteína **(Gt)**; gliceolinas **(Gs)**.

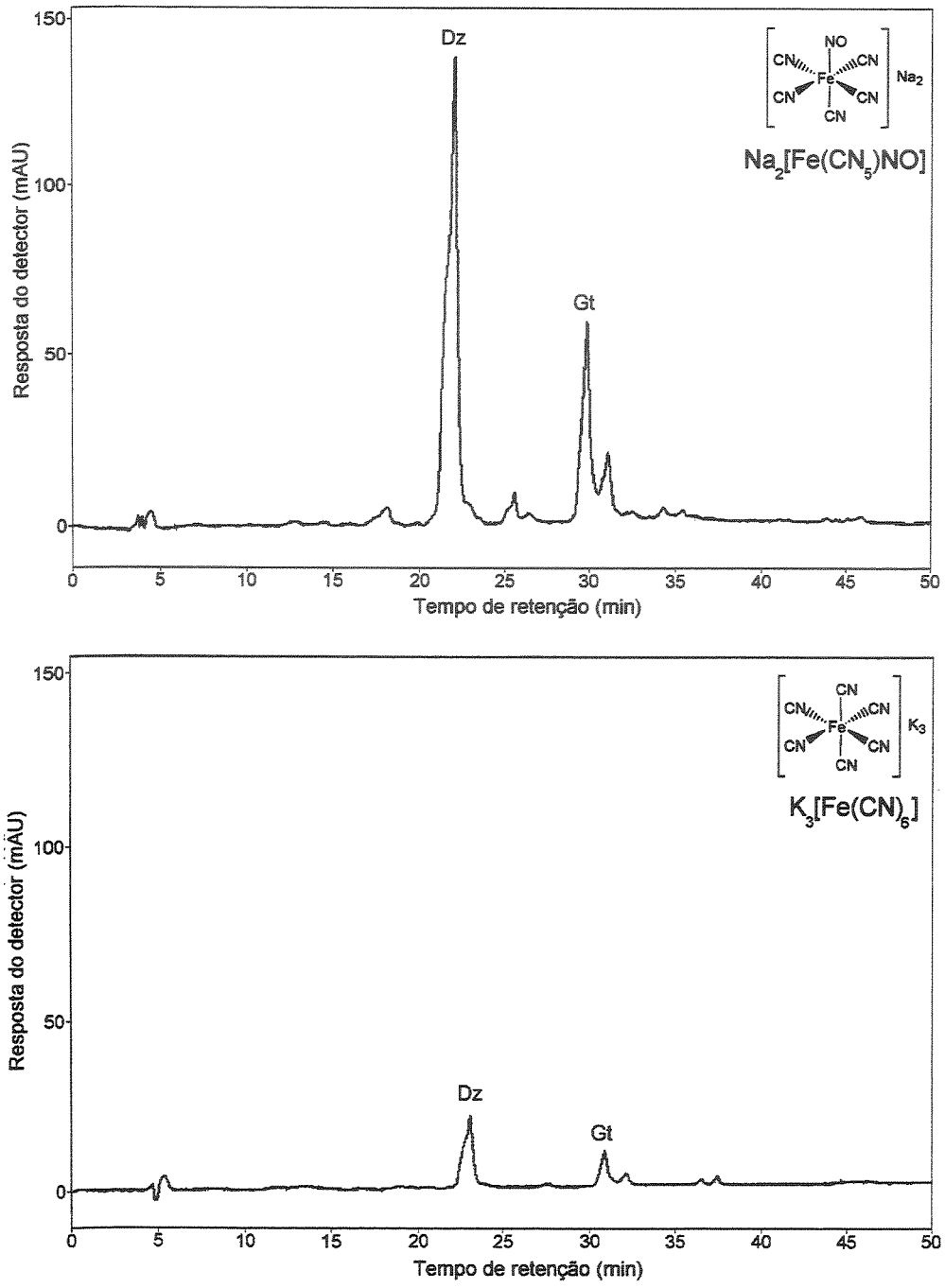

Figura 14: Eliciação de cotilédones de soja por SNP ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) ou seu análogo ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$). Cotilédones do cv. IAC-18 foram tratados com SNP ou ferricianeto (10 mM) e após 20 horas de eliciação os exudatos foram cromatografados por CLAE a 286 nm. **Dz**, daidzeína; **Gt**, genisteína.

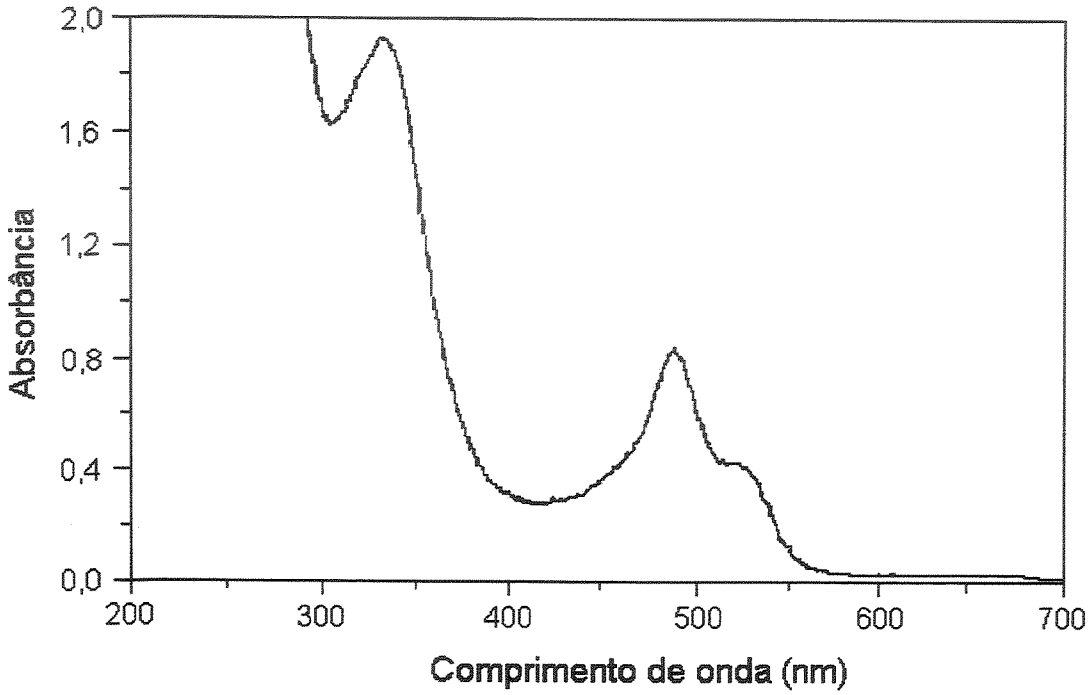

Figura 15: Espectro de absorção na região do UV-VIS dos exudatos de cotilédones de soja eliciados com extrato de Dpm. Cotilédones do cv. IAC-18 foram tratados com extrato de Dpm (13 μg/50 μL). Após 20 horas de eliciação os exudatos de 20 cotilédones (sem diluição) foram analisados espectrofotometricamente na região compreendida entre 200 e 700 nm.

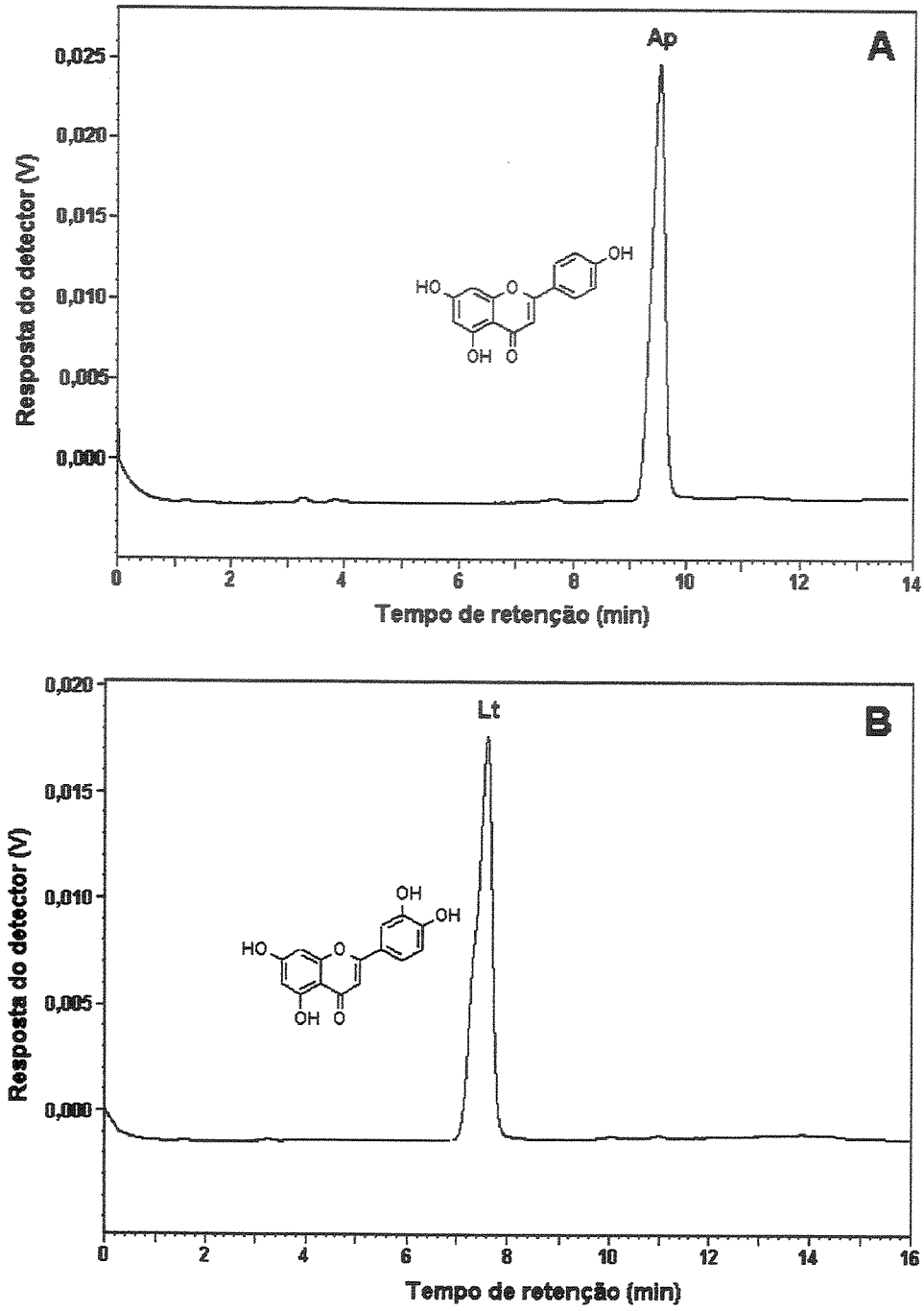

Figura 16: Perfil cromatográfico dos padrões de apigenina (A) e luteolina (B). Padrões autênticos de apigenina **(Ap)** e luteolina **(Lt)** foram cromatografados por CLAE a 336 e 350 nm, respectivamente.

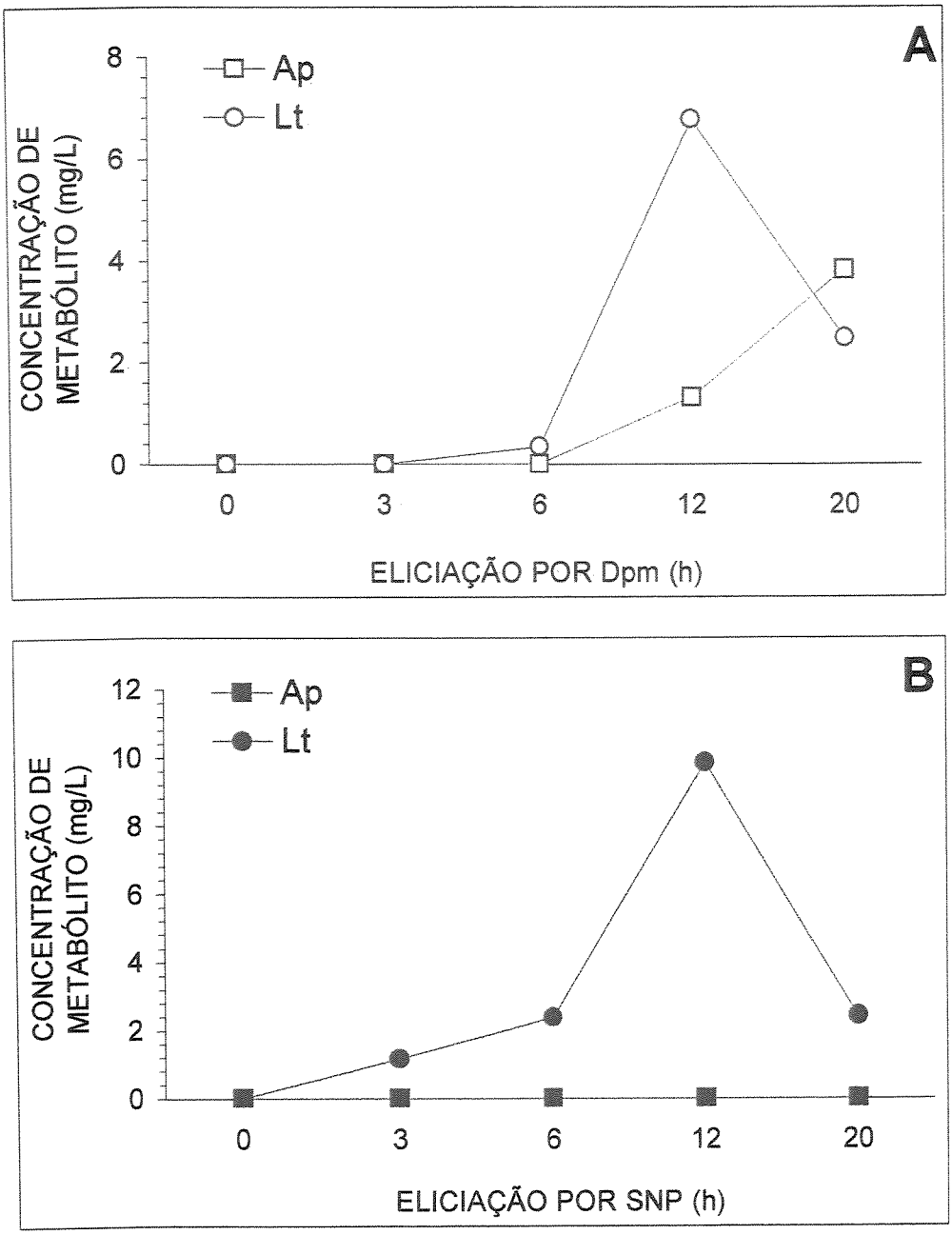

Figura 17: Quantificação das flavonas produzidas por cotilédones de soja cv. IAC-18 em resposta ao Dpm (A) e SNP (B). As concentrações dos metabólitos foram determinadas a partir de curvas de concentração dos padrões de apigenina **(Ap)** e luteolina **(Lt)**.

4.5. Indução de atividade óxido nítrico sintase em cotilédones eliciados

Após a eliciação dos cotilédones de soja com extrato de Dpm ou SNP e remoção dos exudatos para a determinação da produção de fitoalexinas, os tecidos em contato com o ponto de aplicação do eliciador foram coletados. Estes foram homogeneizados e a fração citossólica, preparada por centrifugação diferencial conforme descrito em Material e Métodos, foi utilizada para a determinação de atividade NOS através da síntese de L-[U-^{14}C] citrulina a partir de L-[U-^{14}C] arginina. A atividade NOS dos tecidos foi determinada nos tempos 0, 3, 6, 12 e 20 horas de eliciação. A síntese de L-[U-^{14}C] citrulina foi avaliada na presença de todos os substratos e cofatores da NOS de origem animal, a saber, NADPH, FAD, FMN, calmodulina, BH_4 e L-[U-^{14}C] arginina. Os valores obtidos nestas condições representaram a síntese total de L-[U-^{14}C] citrulina.

Para se determinar a atividade NOS foi acrescentado ao meio L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil éster) e AMG (aminoguanidina). O L-NAME é um análogo estrutural da L-arginina e inibidor da NOS de origem animal, sendo um inibidor competitivo da isoforma induzida e um inibidor irreversível das isoformas constitutivas (Baylis *et al.*, 1995). O AMG, apesar de não ser um análogo estrutural da L-arginina, é um inibidor irreversível tanto da NOS constitutiva quanto da induzida, sendo preferencial para esta última (Laszlo *et al.*, 1995; Wolff *et al.*, 1995). A atividade NOS foi calculada pela diferença entre a síntese total de L-[U-^{14}C] citrulina e aquela inibida por L-NAME e AMG.

A Figura 18A mostra que a eliciação de cotilédones de soja com Dpm induziu atividade NOS, que aumentou com o tempo de eliciação. Na concentração de 1 μM de

L-[U-^{14}C] arginina, utilizada nestes ensaios, uma atividade máxima NOS de 3 pmol de L-[U-^{14}C] citrulina/h/mg foi observada com 6 horas, havendo um decréscimo de atividade nos tempos maiores de eliciação. Diferentemente do observado para Dpm, a eliciação com SNP não foi capaz de induzir atividade NOS em nenhum dos tempos de eliciação analisados (Figura 18A).

Com o objetivo de se caracterizar a atividade NOS dos cotilédones de soja quanto a dependência de Ca^{2+}, as determinações de atividade foram também realizadas na presença de EGTA, um agente quelante específico para este cátion. A atividade NOS Ca^{2+}-dependende foi calculada pela diferença entre a síntese total de L-[U-^{14}C] citrulina e aquela obtida na presença de EGTA. Os tecidos de soja eliciados com Dpm apresentaram atividade NOS Ca^{2+}-dependente com um perfil semelhante ao obtido para a atividade NOS sensível aos inibidores (Figura 18A), ou seja, uma atividade máxima após 6 horas de eliciação (Figura 18B). Neste tempo, a atividade NOS Ca^{2+}-dependente dos cotilédones eliciados com Dpm foi de 3,6 pmol L-[U-^{14}C] citrulina/h/mg na presença de 1 μM de L-[U-^{14}C] arginina. Não foi observada síntese de L-[U-^{14}C] citrulina dependente de Ca^{2+} nos cotilédones eliciados por SNP (Figura 18B). Comparando-se a atividade NOS dos cotilédones eliciados por 6 horas com Dpm observou-se uma atividade dependente de Ca^{2+} (3,6 pmol L-[U-^{14}C] citrulina/h/mg) que foi 20% maior que aquela inibida por L-NAME e AMG (3,0 pmol L-[U-^{14}C] citrulina/h/mg). Estes resultados poderiam indicar que os compostos utilizados estariam causando uma inibição parcial da atividade NOS detectada nos cotilédones de soja. Na tentativa de encontrar um inibidor mais potente para estes tecidos um experimento foi montado utilizando-se L-NIL [L-N^6-(1-iminoetil) lisina]. Este é um potente inibidor da

NOS de origem animal, sendo cerca de 28 vezes mais seletivo para a NOS induzida do que para a cerebral (Moore *et al.* 1996; Connor *et al.* 1995). Nestes ensaios, utilizou-se L-[U-^{14}C] arginina a 10 μM com o objetivo de se obter maiores valores absolutos de atividade. Ainda, foi também determinada a síntese de L-[U-^{14}C] citrulina na ausência de NADPH, substrato essencial para a atividade NOS. Os cotilédones foram eliciados com Dpm, SNP ou tratados com água (controle) e, após 6 horas, os extratos foram preparados para a determinação da atividade NOS. A Figura 19A apresenta os valores de síntese de L-[U-^{14}C] citrulina obtidos no meio de reação completo (atividade total), na presença de L-NIL, na presença de EGTA e na ausência de NADPH. Como pode ser observado, a síntese total de L-[U-^{14}C] citrulina não é alterada em nenhuma das condições testadas nos cotilédones-controle e naqueles eliciados por SNP. Estes resultados mostram que esta incorporação de L-[U-^{14}C] citrulina é inespecífica, não podendo ser considerada como atividade NOS. A Figura 19B mostra a atividade NOS sensível ao inibidor L-NIL, dependente de Ca^{2+} e de NADPH. Nota-se que apenas os tecidos de cotilédones de soja eliciados com extrato de Dpm foram sensíveis ao inibidor L-NIL, apresentando uma atividade de 7,7 pmol L-[U-^{14}C] citrulina/min/mg. Uma atividade Ca^{2+}-dependente de 7,8 pmol L-[U-^{14}C] citrulina/min/mg foi encontrada nestes tecidos quando ensaiados na presença de EGTA. Nas condições de ensaio, o L-NIL causou uma inibição de 72,1% da atividade e o EGTA diminuiu a produção de L-[U-^{14}C] citrulina em 73,1% quando comparada à síntese total. Também foi observada uma atividade dependente de NADPH (5,8 pmol L-[U-^{14}C] citrulina/min/mg) que correspondeu a um valor 25% menor que aquele encontrado para a inibição por L-NIL. Estes resultados mostraram que os tecidos de cotilédones eliciados com extrato de

Dpm por um período de 6 horas apresentam relativa sensibilidade ao NADPH, uma vez que, 54,5% da produção de L-[U-^{14}C] citrulina foi inibida na ausência deste substrato.

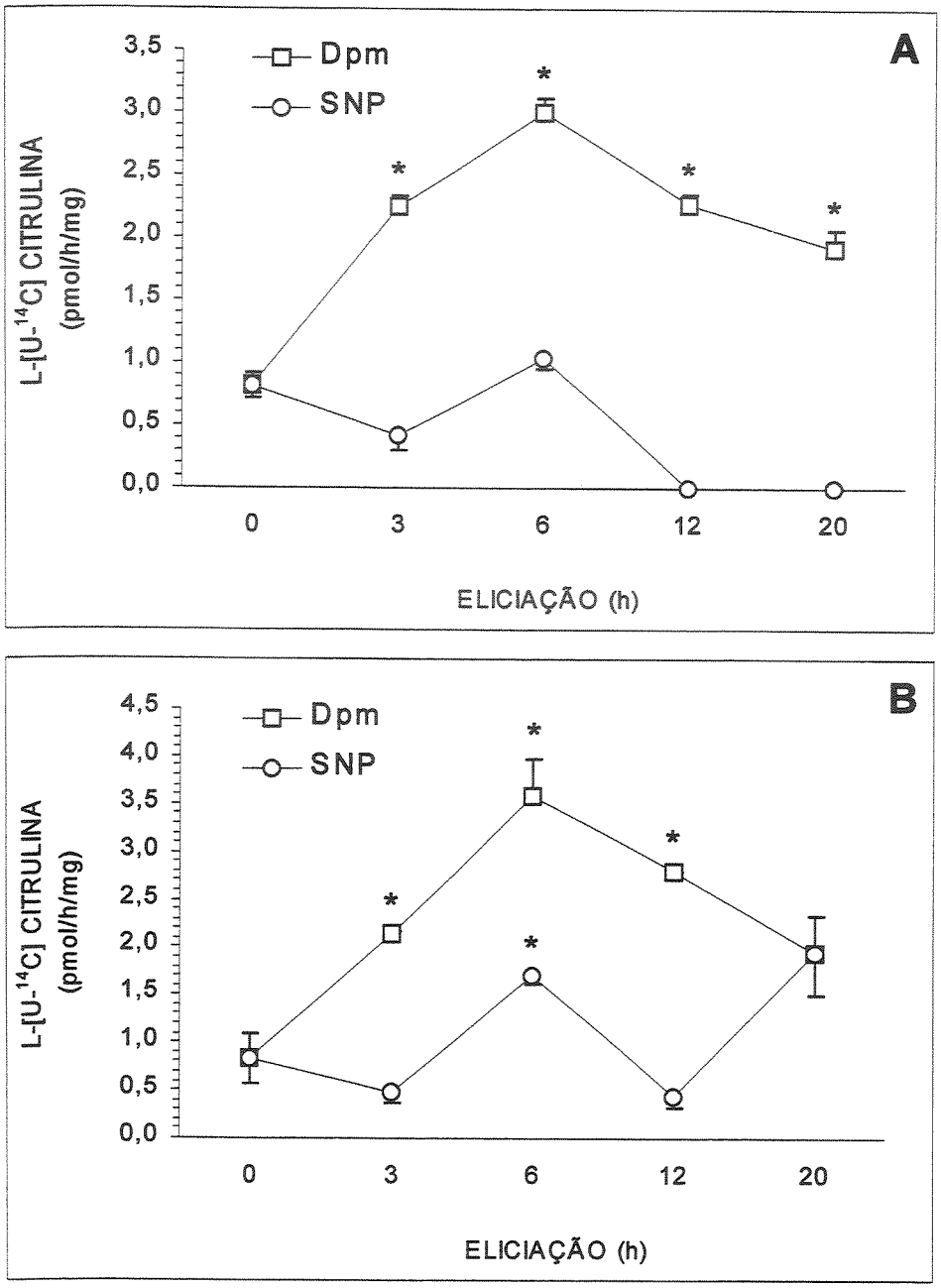

Figura 18: Atividade NOS do tipo Ca^{2+}-dependente em cotilédones de soja eliciados com Dpm. Tecidos de soja cv. IAC-18 oriundos de cotilédones eliciados com Dpm ou SNP em diferentes tempos, como indicado, foram incubados com 1 μM L-[U ^{14}C]-arginina (350 μCi/μmol). **A**, atividade NOS sensível a L-NAME e AMG (3 mM cada); **B**, atividade NOS Ca^{2+}-dependente (inibida na presença de EGTA 2 mM). Cada ponto representa a média ± EPM de 2 experimentos com triplicata. *, $P < 0,05$, significativamente diferente do controle (tempo 0).

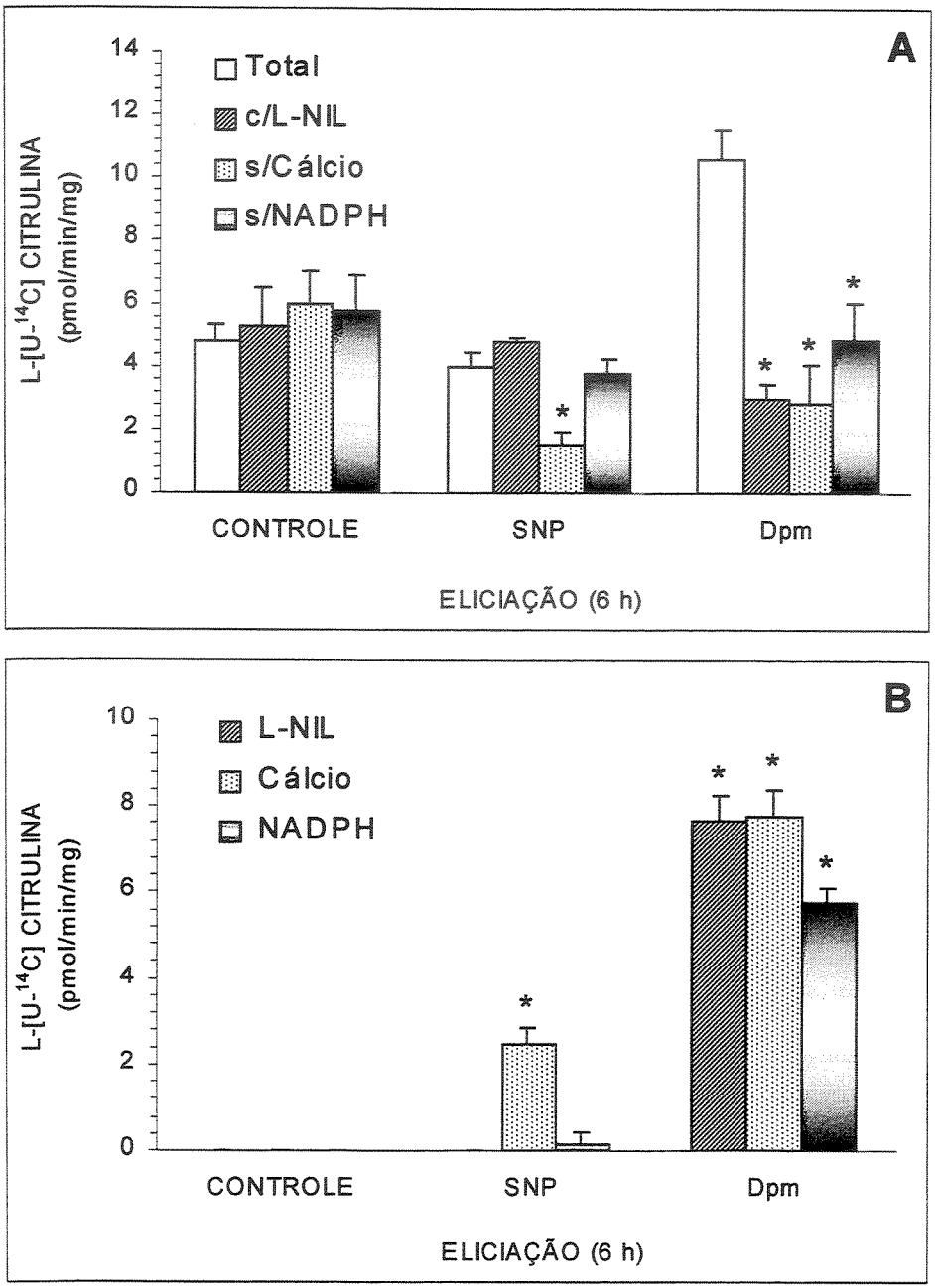

Figura 19: Atividade NOS sensível a L-NIL, dependente de Ca^{2+} e NADPH, em cotilédones de soja eliciados com Dpm. Tecidos de soja cv. IAC-18 oriundos de cotilédones eliciados com Dpm ou SNP por 6 h foram incubados com 10 μM L-[U-^{14}C]-arginina (70 μCi/μmol). **A**, Produção de L-[U-^{14}C] citrulina total, com L-NIL, com EGTA e sem NADPH, como indicado; **B,** Atividade NOS sensível a L-NIL, Ca^{2+}-dependente e NADPH-dependente. Os valores representam a média ± EPM de experimento com triplicata. *, $P < 0,05$, significativamente diferente do total.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar o envolvimento de uma enzima com atividade óxido nítrico sintase (NOS) no mecanismo de resistência de soja ao fungo causador do cancro da haste. Para atingir tal objetivo foram comparadas a produção de fitoalexinas e a atividade NOS em cotilédones eliciados com extrato do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm) com aquelas induzidas por nitroprussiato de sódio (SNP), uma molécula capaz de liberar NO.

A eliciação dos cotilédones de soja com o extrato de Dpm induziu uma intensa produção de fitoalexinas mostrando ser este, um sistema bastante eficiente para se estudar esta interação patógeno-hospedeiro. Semelhante produção de fitoalexinas foi também induzida quando os cotilédones de soja foram eliciados com SNP, resposta não observada quando este eliciador foi substituído pelo ferricianeto, que difere estruturalmente do SNP apenas por não conter NO. Estes resultados mostraram que o NO liberado do SNP atuou como um eficiente indutor da produção de fitoalexinas neste sistema.

Muitas evidências apontam forte correlação entre a produção de fitoalexinas e a resistência da planta ao ataque de patógeno uma vez que, estes compostos apresentam atividade antimicrobiana e teriam assim a função de conter a infecção (Hammerschmidt, 1999; Harborne, 1999). Entretanto, a produção de fitoalexinas ocorre também em muitas interações compatíveis, ou seja, quando o patógeno consegue se estabelecer na planta hospedeira (Hahn *et al.*, 1985). Acredita-se que a rapidez na

produção de fitoalexinas seria um fator importante na determinação da resistência.

Experimentos de campo, realizados por pesquisadores do Instituto Agronômico de Campinas mostram diferenças de resposta entre o cultivar resistente (IAC-18) e o suscetível (IAC-14) após aproximadamente 30 dias de inoculação do fungo Dpm à haste de plantas de soja. O cultivar resistente apresenta uma coloração vermelha bastante intensa no local da inoculação enquanto que, no cultivar suscetível, IAC-14, a detecção é bem mais tardia, quando a doença já se manifesta (comunicação pessoal, Nelson R. Braga, Centro de Plantas Graníferas-IAC). Não foi observada uma diferença significativa na capacidade de produção de fitoalexinas entre os cultivares, nos ensaios de eliciação de cotilédones. A aplicação do extrato do fungo nos cotilédones foi capaz de induzir uma intensa e rápida produção de fitoalexinas em ambos os cultivares, embora no cv. IAC-18 a produção de pigmentos vermelhos tenha sido ligeiramente maior do que no cv. IAC-14. Estes resultados sugerem que ambos os cultivares seriam capazes de se defender ao ataque do patógeno nos estádios iniciais de desenvolvimento, através da produção de fitoalexinas. Entretanto, a expressão desta característica pelo cultivar IAC-14, parece diminuir com a idade da planta, resultando na suscetibilidade ao patógeno, observada em campo.

A produção de fitoalexinas induzida pelo extrato de Dpm foi parcialmente diminuída quando os cotilédones de soja foram pré-tratados com inibidores característicos da enzima óxido nítrico sintase (NOS) de origem animal. Vários fatores poderiam explicar a inibição parcial da produção de fitoalexinas nestes ensaios como,

baixa absorção dos inibidores pelos tecidos, remoção dos inibidores durante a eliciação e menor afinidade destes para a NOS de origem vegetal.

Esta resposta sugeriu que uma enzima do tipo NOS poderia estar envolvida no mecanismo de defesa de soja ao fungo causador do cancro da haste. A observação de que estes inibidores não tiveram efeito na produção de fitoalexinas quando os cotilédones foram eliciados por SNP fortaleceram esta proposição. Assim, quando esta enzima foi inibida, a resposta pôde ainda ocorrer pois, os cotilédones foram eliciados com uma substância que forneceu seu produto de reação, o NO. Ainda, a eliciação com Dpm induziu atividade NOS nos tecidos em contato com o eliciador. Ao contrário, nenhuma atividade NOS foi observada nos tecidos eliciados por SNP, embora este doador de NO tenha sido eficiente em induzir a produção de fitoalexinas.

Em células animais, a atividade NOS induzida em resposta a infecção é independente de Ca^{2+} (Stuehr, 1992; Stuehr, 1999). Entretanto, a atividade NOS induzida nos cotilédones de soja eliciados pelo extrato de Dpm mostrou ser do tipo Ca^{2+}-dependente, característica anteriormente observada em outras interações fitopatógeno-hospedeiro, como nas relações *Arabidopsis thaliana-Pseudomonas syringae* e fumo-vírus do mosaico do fumo (Delledone *et al.*, 1998).

A indução de atividade NOS precedeu a ativação da síntese de isoflavonóides (daidzeína, genisteína) nos cotilédones eliciados por Dpm. Assim, a atividade máxima NOS ocorreu após seis horas de eliciação, tempo em que a produção destes isoflavonóides era mínima. Produção significativa dos isoflavonóides só ocorreu após 12 horas de eliciação, com conversão para gliceolinas após 20 horas. Diferentemente,

quando os cotilédones de soja foram eliciados por SNP, a produção de isoflavonóides foi mais precoce, já sendo detectada após 3 horas. Estes resultados estão em concordância com a proposta de que o extrato de Dpm ativaria a via dos fenilpropanóides através da NOS. Assim, na eliciação com Dpm, a produção destes compostos só é detectada após ativação da NOS. Por outro lado, a produção destes metabólitos é mais rápida quando o NO é diretamente fornecido.

A ativação na síntese das flavonas induzida pelo extrato de Dpm também ocorreu posteriormente à máxima ativação da NOS. Dessa forma, os acúmulos de apigenina e luteolina só foram observados após 12 horas de eliciação. Apenas a luteolina foi detectada na eliciação por SNP, com uma cinética de produção semelhante àquela induzida por Dpm porém, de maneira precoce, sendo observada já após 3 horas de eliciação. À semelhança do observado na indução de isoflavonóides, a cinética de produção da luteolina foi mais rápida na eliciação por SNP do que por Dpm, onde um incremento significativo só ocorreu após a ativação da NOS. Estes resultados apóiam a proposta de que na eliciação por Dpm ocorre a ativação de uma enzima do tipo NOS produzindo NO que é capaz, então, de ativar a via dos fenilpropanóides.

Sabe-se que a produção de fitoalexinas em várias respostas de defesa ao ataque de patógenos é regulada em nível das enzimas PAL, CHS e CHI (Dixon e Paiva, 1995). A observação de que a eliciação de cotilédones de soja por Dpm estimulou a síntese de isoflavonóides (daidzeína e genisteína), pterocarpanos (gliceolinas) e flavonas (apigenina e luteolina), sugere que o NO endogenamente produzido nesta interação seria capaz de estimular a síntese de fitoalexinas por regular a expressão de

enzimas iniciais da via dos fenilpropanóides. Apoiando esta proposição, Delledone *et al.* (1998) mostraram que o L-NNA (N^G-nitro-L-arginina), um análogo da L-arginina, preveniu o acúmulo de transcritos do gene *PAL* em células de soja inoculadas com a bactéria avirulenta *Pseudomonas syringae*. Este tratamento também preveniu a indução de transcritos da CHS, a primeira enzima de ramificação da via dos fenilpropanóides. Ainda, o SNP foi capaz de induzir a expressão dos genes *PAL* e *CHS* em células de soja em suspensão (Delledone *et al.*, 1998). A expressão do gene *PAL* foi também induzida pela aplicação de doadores de NO, como GSNO e SNAP, em células de fumo em suspensão, bem como pela injeção de NOS de mamíferos em plantas de fumo (Durner *et al.*, 1998).

Por outro lado, também já foram descritas observações de que a biossíntese de fitoalexinas pode não depender apenas da indução de enzimas iniciais da via dos fenilpropanóides. Os trabalhos do grupo de Graham mostraram que a eliciação de cotilédones de soja com o fungo *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* induziu no cultivar resistente uma rápida hidrólise de conjugados glicosídicos de daidzeína e genisteína pré-existentes nos tecidos, resultando na liberação de grandes quantidades destes isoflavonóides (Graham *et al.*, 1990). A daidzeína livre foi utilizada como precursora para a síntese de gliceolinas (Graham *et al.*, 1990), enquanto que, a genisteína livre foi diretamente tóxica para *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (Graham e Graham, 1989). Assim, o NO produzido em resposta a eliciação dos cotilédones por Dpm poderia estar alternativamente ativando as enzimas responsáveis pela hidrólise de conjugados glicosídicos de daidzeína e genisteína, ou ainda, enzimas envolvidas nas etapas finais da síntese das gliceolinas, como aquelas responsáveis pela prenilação e posterior ciclização da daidzeína. Embora este possa ser um caminho alternativo, a

ativação de enzimas iniciais da via dos fenilpropanóides na resposta de soja ao Dpm via NOS não pode ser descartada, uma vez que, a síntese das flavonas apigenina e luteolina foi também observada, síntese esta, que depende da CHS, enzima que atua no ponto de ramificação para a formação de fitoalexinas e flavonas.

Apesar de estar bem documentada a função antimicrobiana das fitoalexinas, o papel de flavonas, como a apigenina e a luteolina, no mecanismo de resistência das plantas ao ataque de patógenos não tem sido explorado. A atividade anti-inflamatória destas moléculas em células de mamíferos, tem sido atribuída à característica antioxidante destes compostos, bem como, a uma ação regulatória da produção de NO, através da inibição da expressão da NOS (Kim *et al.*, 1999). Uma atuação similar da apigenina e luteolina em vegetais poderia ser responsável por atenuar os efeitos tóxicos do NO no local da infecção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYERS, A. R., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N., ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. 9. quantitative assays of elicitor activity and characterization of elicitor present in extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology*, v. 57, n. 5, p. 751-759, 1976a.

AYERS, A. R., EBEL, J., VALENT, B., ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions.10. fractionation and biological-activity of an elicitor isolated from mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology*, v. 57, n. 5, p. 760-765, 1976b.

BAILEY, J. A., MANSFIELD, J., W., *Phytoalexins*. Blackie & Son Limited: Bishopbriggs, Glasgow, 334 p., 1982.

BAKER, C. J., ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, v. 33, p. 299-321, 1995.

BAYLIS, C., MASILAMANI, S., LOSONCZY, G., SAMSELL, L., HARTON, P., ENGELS, K. Blood-pressure (BP) and renal vasoconstrictor responses to acute blockade of nitric-oxide - persistence of renal vasoconstriction despite normalization of bp with either verapamil or sodium-nitroprusside. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 274, n. 3, p. 1135-1141, 1995.

BELIGNI, M. V., LAMATTINA, L., Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Science*, v. 4, p. 299-300, 1999a.

BELIGNI, M. V., LAMATTINA, L., Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, v. 3, n. 3, p. 199-208, 1999b.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology*, v. 11, n. 2, p. 66-75.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRISSON, L. F., TENHAKEN, R., LAMB, C. Function of oxidative cross-linking of cell-wall structural proteins in plant-disease resistance. *The Plant Cell*, v. 6, n. 12, p. 1703-1712, 1994.

CHABRIER, P. E., DEMERLE-PALLARDY, C, AUGUET, M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 55, n. 8-9, p. 1029-1035, 1999.

CONNOR, J. R. MANNING, P. T., SETTLE, S. L., MOORE, W. M., JEROME, G. M., WEBBER, R. K., TJOENG, F. S., CURRIE, M. G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, v. 273, n. 1-2, p. 15-24, 1995.

COONEY, R. V., HARWOOD, P. J., CUSTER, L. J., FRANKE, A. A. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, n. 5, p. 460-462, 1994.

CUETO, M., HERNÁNDEZ-PERERA, O., MARTIN, R., BENTURA, M. L., RODRIGO, J., LAMAS, S., GOLVANO, M. P. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*, v. 398, n. 2-3, p. 159-164, 1996.

DEAN, J. V., HARPER, J. E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology*, v. 88, n. 2, p. 389-395, 1988.

DELLEDONNE, M., XIA, Y. J., DIXON, R. A., LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, v. 394, n. 6693, p. 585-588, 1998.

DIXON, R. A. PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURNER, J., WENDEHENNE, D., KLESSIG, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 17, p. 10328-10333, 1998.

EMBRAPA., Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa de soja 1988/89. 405 p., (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 43), Londrina, 1989.

FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., POLLOCK, J. S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., NAKANE, M., MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization na purification from different cell types. *Biochemical Pharmacology*, v. 42, n. 10, p. 1849-1857, 1991.

GARCÍA-VIGUERA, C., ZAFRILLA, P., ARTÉS, F., ROMERO, F., ABELLAN, P., TOMAS-BARBERAN, F.A. Color and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal of Science and Food Agriculture*, v. 78, p. 565-573, 1998.

GASTON, B., Nitric oxide and thiol groups. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, n. 2-3, p. 323-333, 1999.

GOUVÊA, C. M. C. P., SOUZA, J. F., MAGALHÃES, A. C. N., MARTINS, I. S. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, v. 21, n. 3, p. 183-187, 1997.

GRAHAM, T. L., GRAHAM, M, Y. PMG wall glucan is an efficient elicitor of isoflavones but is not an efficient elicitor of glyceollin in soybeans. *Phytopathology*, 79, p. 1150, 1989.

GRAHAM, T. L., KIM, J. E., GRAHAM, M. Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with phytophthora-megasperma. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 3, n. 3, p. 157-166, 1990.

HAHN, M. G., BONHOFF, A., GRISEBACH, H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiology*, v. 77, n. 3, p. 591-601, 1985.

HARBORNE, J. B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, n. 4, p. 335-367, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R., Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual. Review of Phytopathology*, v. 37, p. 285-306, 1999.

HUANG, J. S., KNOPP, J. A. Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction in tobacco. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, p. 218-224, 1998.

HUFTON, C. A., BESFORD, R. T., WELLBURN, A. R. Effects of NO (+NO_2) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO_2 enrichment. *New Phytologist*, v. 133, n. 3, p. 495-501, 1996.

INGHAM, J. L., KEEN, N. T., MULHEIRN, L. J., LYNE, R. L. Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean. *Phytochemistry*, v. 20, n. 4, p. 795-798, 1981.

INGHAM, J. L. Phytoalexins from the Leguminosae. *In* BAILEY, J. A., MANSFIELD, J., W., *Phytoalexin*, Blackie & Son Limited: Bishopbriggs, Glasgow, p. 21-80, 1982.

JAFFREY, S. R., SNYDER, S. H. Nitric oxide: a neural messenger. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 11, p. 417-440, 1995.

KEEN, N. T. Phytoalexins - efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. *Phytopathology*, v. 68, n. 8, p. 1237-1239, 1978.

KIM, H. K., CHEON, B. S., KIM, Y. H., KIM, S. Y., KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7 and their structure – activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, v. 5, p. 759-765, 1999.

KLEPPER, L., Comparison between NO_x evolution mechanisms of wild-type and nr_1 mutant soybean leaves. *Plant Physiology*, v. 93, n. 1, p. 26-32, 1990.

KLESSIG, D. F., DURNER, J. NOAD, R., NAVARRE, D. A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J. M., SHAH, J., ZHANG, S. Q., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E., SILVA, H. Nitric oxide and salycilic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 16, p. 8849-8855, 2000.

KRZYZANOWSKI, F. C., FRANÇA NETO, J. B., HENNING, A. A. Sementes de soja; cuidados na aquisição e na utilização. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 7 p., (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 52), 1992.

KUĆ, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 33, p. 275-297, 1995.

LASZLO, F. EVANS, S. M., WHITTLE, B. J. R. Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature *in vivo*. *European Journal of Pharmacology*, v. 272, n. 2-3, p. 169-175, 1995.

LESHEM, Y. Y. Nitric oxide in biological systems. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 18, n. 3, p. 155-159, 1996.

LOWE, D. T. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, v. 4, n. 4, p. 441-458, 2000.

LOW, P. S., MERIDA, J. R. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, v. 96, n. 3, p. 533-542, 1996.

MATHIEU, C., MOREAU, S., FRENDO, P., PUPPO, A., DAVIES, M. J. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: Presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 24, n. 7-8, p. 1242-1249, 1998.

MAYER, B., HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, *Trends in Biochemical Science*, v. 22, p. 477-481, 1997.

MAYER, K. *et al.* Sequence and analysis of chromosome 4 of the *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v. 402, n. 6763, p. 769, 1999.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOORE, W. M., WEBBER, R. K., FOK, K. F., JEROME, G. M., CONNOR, J. R., MANNING, P. T., WYATT, P. S., MISKO, T. P., TJOENG, F. S., CURRIE, M. G. 2-Iminopiperidine and other 2-iminoazaheterocycles as potent inhibitors of human nitric oxide synthase isoforms. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 3, p. 669-672, 1996.

NAVARRE D. A., WENDEHENNE, D., DURNER, J., NOAD, R., KLESSIG, D. F. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology*, v. 122, n. 2, p. 573-582, 2000.

NINNEMANN, H., MAIER, J. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa Photochemistry and Photobiology*, v. 64, n. 2, p. 393-398, 1996.

NORITAKE, T., KAWAKITA, K., DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, v. 37, n. 1, p. 113-116, 1996.

PALEVITZ, B. A., LEWIS, R. Erectile dysfunction - serious research from a serious problem. *The Scientist*, v. 12, n. 20, p. 1, 1998.

PAXTON, J. D. Phytoalexins - a working re-definition. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, v. 101, n. 2, p. 106-109, 1981.

PEDROSO, M. C., MAGALHÃES, J.R., DURZAN, D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Science*, v. 157, n. 2, p. 173-180, 2000.

PELICICE, F. M., DIETRICH, S. M. C. BRAGA, M. R. Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 1, p. 45-53, 2000.

REES, D. D., CUNHA, F. Q., ASSREUY, J., HERMAN, A. G., MONCADA, S. Sequential induction of nitric-oxide synthase by corynebacterium-parvum in different organs of the mouse. *British Journal of Pharmacology*, v. 114, n. 3, p. 689-693, 1995.

RIBEIRO, E. A., CUNHA, F. Q., TAMASHIRO, W. M. S. C., MARTINS, I. S. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters*, v. 445, n. 2-3, p. 283-286, 1999.

SANDER, M., CHAVOSHAN, B., HARRIS, S. A., IANNACCONE, S. T., STULL, J. T., THOMAS, G. D., VICTOR, R. G. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13818–13823, 2000.

SAVIANI, E. E., ORSI, C. H., SALGADO, I. Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Letters*. (submetido).

SHISHIDO, S., M. *Fotoquímica de doadores de óxido nítrico:decomposição do nitroprussiato de sódio e da S-nitroso-L-cisteína em matrizes de água e poli(etilenoglicol)*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, Tese de Mestrado, 1998.

SHISHIDO, S. M., DE OLIVEIRA, M. G. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from *S*-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochemistry and Photobiology*, v. 71, n. 3, p. 273-280, 2000.

STAMLER, J. S., SINGEL, D. J., LOSCALSO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-actived forms. *Science*, v. 258, n. 5090, p. 1898-1902, 1992.

STRACK, D. Metabolism phenolic. *In* DEY, P. M., HARBORNE J. B. *Plant Biochemistry*, Academic Press: Great Britain, p. 388-416, 1997.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzimology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 65, p. 287-346, 1992.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 37, p. 339-359, 1997.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, n. 2-3, p. 217-230, 1999.

TYLER, J. M. Characterization of stem canker resistance in "Hutcheson" soybean. *Crop Science*, v. 36, n. 3, p. 591-593, 1996.

WELLBURN, A. R., Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? *New Phytologist*, v. 115, n. 3, p. 395-429, 1990.

WELLE, R., GRISEBACH, H. Phytoalexin synthesis in soybean cells - elicitor induction of reductase involved in biosynthesis of 6'-deoxychalcone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 272, n. 1, p. 97-102, 1989.

WILDT, J., KLEY, D., ROCKEL, A., ROCKEL, P., SEGSCHNEIDER, H. J. Emission of NO from several higher plant species, *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, v. 102, n. 5, p. 5919-5927, 1997.

WOJTASZEK, P. Nitric oxide in plants - to no or not to no. *Phytochemistry*, v. 54, n. 1, p. 1-4, 2000.

WOLFF, D. J., LUBESKIE, A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric-oxide synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 316, n. 1, 290-301, 1995.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y., TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science*. v. 4, n. 4, p. 128-129, 1999.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, v. 468, v. 1, p. 89-92, 2000.

YORINORI, J. T. Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle. Londrina: Embrapa Soja, 75 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 14), 1996.

ZÄHRINGER, U., SCHALLER, E., GRISEBACH, H. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. structure and reactions of naturally occurring and enzymatically prepared prenylated from elicitor-treated cotyledons and cell cultures of soybean. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, v. 36, n. 3-4, p. 234-241, 1981.