SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Rodrigo Luís Rahal

ATIVIDADE INDUTORA DE FITOALEXINAS E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FUNGITÓXICAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Sesbania marginata* Benth

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) RODRIGO LUÍS RAHAL
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Braga

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R129a
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 60081
PROC 16-83702
C ____ D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 30/07/02
Nº CPD ____

CM00171051-4

BIB ID 248371

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R129a

Rahal, Rodrigo Luís
Atividade indutora de fitoalexinas e produção de substâncias fungitóxicas durante a germinação de sementes de *Sesbania marginata* Benth/ Rodrigo Luís Rahal.--
Campinas, SP:[s.n.], 2002

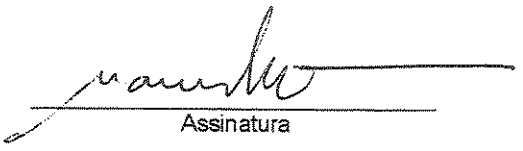
Orientadora: Márcia Regina Braga
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

1.Semente. 2.Defesa. 3.Carboidratos. I.Braga, Márcia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 08/03/2002

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Márcia Regina Braga (Orientadora)

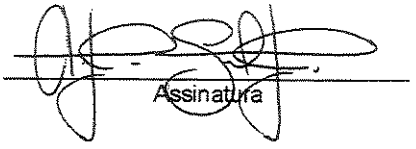


Assinatura

Profa.Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich

Assinatura

Prof.Dr. Antonio Salatino



Assinatura

Prof.Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Assinatura

UNICAMP 22

Há homens que lutam um dia,
E são bons
Há outros que lutam um ano,
E são muito bons
Há aqueles que lutam muitos anos,
E são muito bons
Há aqueles que lutam toda a vida,
São os imprescindíveis.

Bertold Bretch

A todos aqueles que me ajudaram
e acreditaram na minha
caminhada, em todos os
momentos de minha vida, até
então...

Ofereço

À sapiência, a mais pura habilidade
divina que um ser de nossa espécie
pode possuir, a arma conversora da
ignorância humana...

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Marcia Regina Braga, minha orientadora, por sua sabedoria, sinceridade e por sua forte representatividade com relação a meu desenvolvimento enquanto biólogo;

ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, pela co-orientação, estímulo e incentivo durante o trabalho, além das ótimas discussões, no mínimo enigmáticas;

à Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, pela utilização do laboratório e a todos os pesquisadores, funcionários de apoio e estagiários;

aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas;

ao Instituto Agronômico de Campinas, pela cessão de sementes de soja;

ao Prof. Dr. Alberto Cavalheiro, do Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual Paulista de Araraquara, pela paciência, amizade e orientação nas análises de compostos secundários;

ao Prof. Massuo Jorge Kato, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^{1}H) e de carbono13 (^{13}C);

ao mestre Denis Ubeda de Lima, pela amizade em todos os momentos difíceis pelos quais passei, e claro, por ter me instruído no uso do HPLC;

à Sra. Mary, da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade e ajuda nas compras de produtos utilizados nos experimentos (sem ela, não teria comprado nada);

ao mestrando César Serafim Lisboa, pela grande amizade, companhia em vários experimentos noturnos e várias pizzadas no laboratório;

aos amigos: ClóvisI, ClóvisII, Kelly, Fausto, Henrique, Lourdes, Paulinha, Claudinha, Rondon, Amanda Souza, Amanda Asega, Tiné, Minhoto, Ana Russa, Ana Má, Aidar, entre outros, pela amizade e paciência em todos os momentos;

ao Flávio, pelo estímulo e amizade, em tantos momentos de tensão e mau humor que passei (um entusiasta da pesquisa, da ciência e da educação brasileira);

a meu pai, minha mãe e meu irmão pelo apoio e à Paty, pelo amor e estímulo, que fez com que acreditasse em mim, em todos os momentos de dificuldades;

à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO 10

ABSTRACT 11

CAPITULO I

ATIVIDADE INDUTORA DE FITOALEXINAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Sesbania marginata* Benth.

INTRODUÇÃO 12

Polissacarídeos de reserva em sementes 12

Polissacarídeos de reserva de parede celular 13

Galactomananos – Estrutura, função e ocorrência 14

Carboidratos de parede celular como moléculas sinalizadoras 15

OBJETIVOS 20

MATERIAL BIOLÓGICO 21

MÉTODOS 21

1. Germinação das sementes 21

2. Extração de açúcares solúveis 22

3. Quantificação de carboidratos e compostos fenólicos 23

4. Detecção de atividade indutora de fitoalexinas 23

5. Análise de carboidratos por cromatografia líquida de alta resolução (HPAEC/PAD) 24

6. Caracterização da atividade biológica em extratos de endosperma+testa 24

7. Fracionamento dos extratos de endosperma+testa por cromatografia de troca iônica ... 25

8. Cromatografia em camada delgada dos extratos de endospermas isolados 25

9. Cromatografia em coluna de Bio Gel P-2 dos extratos de endospermas isolados 25

10. Detecção de atividade indutora de fitoalexinas nas frações da coluna Bio Gel P-2 26

11. Hidrólise ácida das frações provenientes da coluna de Bio Gel P-2 26

RESULTADOS 28

DISCUSSÃO 55

CAPITULO II

EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE INIBIDORA DO CRESCIMENTO DE FUNGOS EM SEMENTES DE *Sesbania marginata* Benth.

INTRODUÇÃO 61

1. Alelopatia: uma relação entre planta e ambiente 61

2. Compostos com atividade antifúngica em plantas 63

OBJETIVOS 66

MATERIAL BIOLÓGICO 67

MÉTODOS 67

1. Extração de substâncias fungitóxicas dos exsudados de sementes de *S. marginata* Benth.

1.1 Germinação das sementes 67

1.2 Extração e fracionamento das substâncias fungitóxicas por cromatografia em coluna de XAD-2 68

1.3 Fracionamento dos extratos resultantes da coluna de XAD-2 69

1.4 Bioautografia das frações provenientes da coluna de sílica 69

2. Extração de substâncias fungitóxicas de sementes íntegras de *S. marginata* Benth.

2.1 Germinação das sementes 71

2.2 Extração de substâncias fungitóxicas do pó de sementes 71

2.3 Fracionamento do extrato metanólico 72

2.4 Cromatografia preparativa em camada delgada das amostras reunidas 72

2.5 Análise das frações reunidas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) 73

RESULTADOS 75

1. Substâncias fungitóxicas dos exsudados de sementes 75

2. Substâncias fungitóxicas de sementes intactas 80

DISCUSSÃO 86

CONCLUSÕES 90

BIBLIOGRAFIA 91

RESUMO

Sesbania marginata Benth. é uma leguminosa tropical que acumula galactomanano nas paredes celulares espessadas do endosperma de suas sementes. Este polissacarídeo de reserva é formado por resíduos de D-manose, ligados entre si por ligações β-1,4, formando uma cadeia principal linear, com resíduos de D-galactose unidos a esta através de ligações α-1,6. Durante o processo de germinação, o galactomanano é completamente degradado e considerável quantidade de monossacarídeos e oligossacarídeos é produzida e translocada para o embrião em crescimento. Concomitantemente ao processo de germinação, há a produção de moléculas indutoras de fitoalexinas e a liberação de substâncias fungitóxicas para os exsudados das sementes. Neste trabalho, investigou-se a possibilidade de que oligossacarídeos provenientes da degradação do galactomanano possam induzir a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja – material-teste utilizado para avaliar a atividade indutora – além de se analisar as substâncias fungitóxicas produzidas normalmente pelas sementes de *S. marginata*. Extratos de endospermas+testa do 4° ao 6° dias de germinação e de endospermas isolados no 1° e 5° dias de germinação mostraram-se mais eficazes na indução da síntese de fitoalexinas. O fracionamento em coluna de Bio Gel-P2 indicou que as moléculas ativas, presentes em algumas frações, eram compostas por dois resíduos de manose e um de galactose, possivelmente correspondentes a trissacarídeos resultantes da degradação do galactomanano. Os compostos fungitóxicos foram extraídos de exsudados de sementes e de sementes intactas após 48 horas de germinação. Pelo menos quatro substâncias fungitóxicas foram detectadas, sendo algumas delas já presentes em sementes quiescentes e outras encontradas após o 1° dia de germinação. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, além de regular a embebição de água e servir de fonte de carbono para o embrião em crescimento, durante sua degradação, o galactomanano pode originar fragmentos que possivelmente ativam respostas de defesa em tecidos de sementes de *S. marginata*. A liberação desses fragmentos e a presença de substâncias fungitóxicas em exsudados da semente dessa espécie parecem estar intimamente relacionados ao metabolismo de seus carboidratos de reserva, permitindo que as sementes germinem e as plântulas se desenvolvam em um ambiente altamente competitivo.

ABSTRACT

Sesbania marginata Benth is a tropical legume that stores galactomannan in its thickened endospermic cell walls. These polysaccharides are composed of a linear backbone of β-1,4- linked D-mannose residues to which D-galactose residues are attached by α-1,6 linkages. Following germination, the galactomannan is completely broken down producing considerable amounts of mono and oligosaccharides, which are transferred to the growing embryo. Concomitantly, phytoalexin-inducing molecules are produced and fungitoxic compounds are released from the germinating seeds. In the present work we investigated the possibility of some oligosaccharides generated during galactomanan degradation can induce phytoalexin production in soybean cotyledons – a test species used for assays of eliciting activity- and we extracted the fungitoxic compounds following germination. Extracts from endosperm+coat of 4-6 days of germination and from isolated endosperms of 1 and 5 days of germination were shown to be more effective in promoting phytoalexin production. Fractionation on Bio-Gel P2 column indicated that the active molecules found in some fractions are composed by two manosyl and one galactosyl residues, being a trissaccharide resultant of the galactomannan degradation. Fungitoxic compounds were extracted from seed exsudates and intact seeds after 48 h of germination. At least four fungitoxic substances were detected, some of them already present in quiescent seeds and other appearing after 1 day of germination. Our data suggest that besides playing a role in water imbibition and as a source of carbon for the embryo growth, galactomannans generate fragments that can signal plants to protect themselves by activating defense mechanisms in their tissues following germination. The release of these fragments and the presence of fungitoxic compounds in seeds of *S. marginata* seem to be closely related to their carbohydrate storage metabolism, allowing these seeds to germinate and the seedlings to develop in a highly competitive environment.

CAPITULO I - ATIVIDADE INDUTORA DE FITOALEXINAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Sesbania marginata* Benth

INTRODUÇÃO

Polissacarídeos de reserva em sementes

As sementes são estruturas que surgiram, durante a evolução, como uma estratégia para o estabelecimento de novos indivíduos em uma população. Seu interior guarda um novo indivíduo, apenas esperando as condições propícias para iniciar seu crescimento e desenvolvimento. Dependendo da estratégia de dispersão e de estabelecimento da planta, a morfologia da semente e sua composição química variam. Outras variações podem ocorrer, por exemplo, na resistência e permeabilidade da testa, no grau de desenvolvimento do embrião, e no tipo, quantidade e localização do material de reserva (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

Durante a germinação da semente, o novo indivíduo não tem capacidade autótrofica, ou seja, não faz fotossíntese e nem tampouco pode absorver do solo nutrientes ricos em carbono imprescindíveis ao seu desenvolvimento. Nesse momento, então, se faz necessária a presença de moléculas que lhe forneçam o máximo de energia em um curto espaço de tempo e que sejam ricas em carbono. Essas moléculas são os carboidratos de reserva, agrupados em três classes: sacarose e seus derivados, amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular (Halmer, 1985).

A sacarose é o dissacarídeo mais abundante no reino vegetal (Dey, 1980; Avigad, 1982). Quando ligado à galactose, forma a rafinose, componente principal de uma família de oligossacarídeos presentes em algumas leguminosas (Dey, 1980; Buckeridge & Dietrich, 1996), os quais auxiliam a planta em seu estabelecimento inicial, sendo degradados no início da germinação (Buckeridge et al., 1995).

O amido está presente em sementes maduras, localizado em órgãos de reserva especializados como endospermas de cereais e cotilédones de leguminosas e sua utilização geralmente ocorre nos primeiros estádios de desenvolvimento do embrião (Bewley & Black, 1994).

Embora outros tecidos possam ser adaptados como tecidos de reserva em sementes, o endosperma (tecido extra-embrionário) e o cotilédone (parte do embrião)

são os principais órgãos que têm essa função nas angiospermas (Bryant, 1985; Bewley & Black, 1994). Nesses órgãos, os carboidratos também podem ser acumulados na forma de paredes celulares espessadas, presentes em células vivas ou mortas (Buckeridge *et al.*, 2000).

Polissacarídeos de reserva de parede celular

Muitas sementes possuem carboidratos de reserva nas paredes de suas células endospérmicas ou cotiledonares. Essas moléculas são translocadas para o embrião e este as utiliza como fonte de matéria e energia antes do novo indivíduo se estabelecer. Além de servir como fonte de carbono para o crescimento inicial do embrião, esses carboidratos possuem múltiplas funções, influenciando a embebição de água e a expansão celular durante o desenvolvimento da plântula (Buckeridge & Reid, 1996).

Os carboidratos de reserva de parede celular de sementes estão divididos em três grupos: o *grupo dos xiloglucanos, dos arabinogalactanos e dos mananos* (formado por galactomananos, mananos puros e glucomananos) (Buckeridge & Reid, 1996). A diferença entre esses grupos de polissacarídeos está na sua composição em monossacarídeos, na razão entre eles e no modo em que suas cadeias estão arranjadas.

Os xiloglucanos são polissacarídeos que possuem uma cadeia principal celulósica como glucanos β-1,4 ligados, os quais são ramificados por unidades de α-xilose que ainda podem ser ramificadas por resíduos de β-galactose. Buckeridge *et al.* (1992), estudando sementes de *Copaifera langsdorffii*, identificaram o xiloglucano como principal carboidrato de reserva desta espécie, sendo encontrado nas paredes espessadas dos cotilédones.

Os arabinogalactanos são formados por resíduos de galactose e arabinose com quantidades menores de ácido galacturônico. Buckeridge & Reid (1996), trabalhando com carboidratos de reserva de parede celular de sementes de *Lupinus angustifolius,* identificaram arabinogalactanos nos cotilédones dessa semente.

Os mananos são polissacarídeos de reserva constituídos de uma cadeia principal de resíduos de D-manose unidos entre si por ligações β-1,4, os quais podem

ser substituídos por resíduos de galactose e glucose. Em estudos com sementes, Bewley & Reid (1985) detectaram mananos em Palmae. Glucomananos foram encontrados, por exemplo, em sementes de *Lactuca sativa* (alface) (Buckeridge *et al.*, 2000).

Galactomananos – Estrutura, função e ocorrência

Os galactomananos são hemiceluloses de parede secundária, solúveis em água, que formam dispersões viscosas e estáveis (Neukon, 1989). São formados por resíduos de D-manose ligados entre si por ligações β-1,4 formando uma cadeia principal linear, com resíduos de D-galactose unidos a esta através de ligações α-1,6 (Figura 1) (Buckeridge & Reid, 1996; Scherbukhin & Anulov, 1999). Além de ter a função de carboidrato de reserva, o galactomanano também atua no controle de entrada de água na semente (Reid & Bewley, 1979; Scherbukhin & Anulov, 1999).

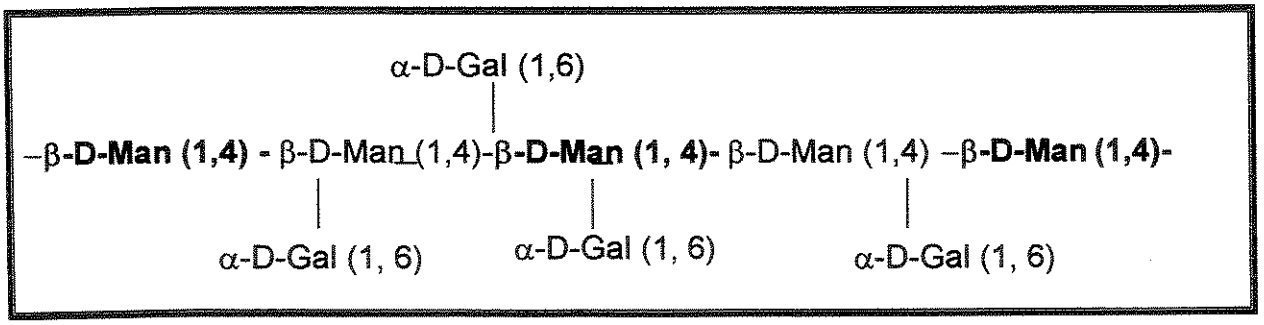


Figura 1. Porção esquematizada da molécula de galactomanano.

A degradação do galactomanano em sementes de leguminosas ocorre pela ação combinada de três hidrolases: uma α-galactosidase, que age sobre as ligações α–1,6 das ramificações de D-galactose; uma endo β-1,4 mananase, que cliva ligações β-1,4, liberando oligossacarídeos de manose e, finalmente, uma β-manosidase ou exo-β-manosidase, que age sobre os mano-oligossacarídeos produzidos pela endo-β-1,4-mananase, liberando monossacarídeos e dissacarídeos (Buckeridge & Reid, 1996).

Os galactomananos são encontrados em células do endosperma de sementes de leguminosas como *Trigonella foenum-graecum* (fenogrego), *Cyamopsis*

tetragonolobus (guar), *Ceratonia siliqua* (caroba) e *Sesbania marginata*, sendo degradados durante a germinação da semente (Reid, 1971; Buckeridge & Dietrich, 1996; Dirk et al., 1999). Sementes de fenogrego, caroba e guar acumulam galactomananos com numerosas substituições de galactose, nas paredes celulares de suas células endospérmicas (Buckeridge *et al.*, 2000).

Em leguminosas, a razão manose:galactose, ou seja, a distribuição de resíduos de galactose ao longo da cadeia principal de manano, varia de espécie para espécie. Neste sentido, as três subfamílias de Leguminosae (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) podem ser separadas pela razão manose: galactose de seu galactomanano (Buckeridge *et al.*, 1995).

Sesbania marginata é uma leguminosa tropical da sub-família Faboideae, que armazena em suas sementes cerca de 21% da matéria seca em galactomanano, na forma de espessamentos da parede celular (Buckeridge & Dietrich, 1990). Suas plantas florescem durante praticamente todo o ano em condições naturais e produzem grande quantidade de sementes. A morfologia de suas sementes é semelhante à de feijão, tendo tamanho um pouco menor. Durante a germinação de sementes de *S. marginata*, o galactomanano é degradado a partir do terceiro dia de germinação, e os oligossacarídeos e monossacarídeos produzidos são translocados para o embrião em crescimento (Buckeridge & Dietrich, 1996).

Carboidratos de parede celular como moléculas sinalizadoras

A parede celular vegetal é um sistema altamente complexo e dinâmico, cuja composição e estrutura variam durante o crescimento e a diferenciação da célula e em respostas a fatores do ambiente (Carpita & Gibeaut, 1993). Dentre suas diversas funções estão, além de acumular compostos de reserva, a de definir a forma e o tamanho da célula, de controlar a taxa de crescimento, o transporte intercelular e de armazenar moléculas sinalizadoras, que parecem regular diversos processos fisiológicos na planta (Brett & Waldron, 1990; Darvill et al., 1992; Aldington & Fry, 1993).

Paredes celulares primárias (presentes em células em crescimento) e secundárias são compostas por carboidratos, glicoproteínas, água e compostos fenólicos, diferindo na proporção entre esses componentes. Em diversas espécies, os

carboidratos encontram-se na forma de polissacarídeos, constituindo cerca de 90% da parede celular, sendo classificados, de acordo com sua solubilidade, em celulose, hemiceluloses e pectinas (Aspinall, 1981).

Na estrutura da parede celular, a celulose constitui o componente fibrilar, sendo encontrada sob a forma de microfibrilas que se associam aos polissacarídeos hemicelulósicos, como xiloglucanos e os arabinoxilanos. As pectinas são características da lamela média e da parede primária, aparecendo em maiores quantidades em dicotiledôneas (Brett & Waldron, 1990).

As pectinas são formadas por uma mistura de polissacarídeos ácidos (homogalacturonanos e ramnogalacturonanos I e II) e neutros (arabinogalactanos, arabinanos), que usualmente se apresentam como ramificações dos polissacarídeos ácidos. Os polissacarídeos pécticos são bastante complexos e formados por resíduos de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e algumas vezes xilose e ácido glucurônico (Brett & Waldron, 1990).

Moléculas sinalizadoras têm sido isoladas das paredes celulares primárias de diversas plantas e descritas como fragmentos dos carboidratos que as compõem. Estes fragmentos são chamados de oligossacarinas e sua ação relaciona-se à regulação de processos fisiológicos, como crescimento, floração e morfogênese (Albersheim *et al.*, 1983, 1992; Gollin *et al.* 1984, Darvill *et al.*, 1992). A descoberta de oligossacarídeos com atividade biológica surgiu de estudos realizados por Hargreaves & Bailey (1978) e por Hahn *et al.* (1981). A maioria destes oligossacarídeos é representada por fragmentos derivados da hidrólise de polímeros de parede celular e foram definidos por Aldington & Fry (1993) como oligômeros bioativos, que embora sejam ricos em resíduos de açúcar, também podem conter material não glicosídico, como fenóis, peptídeos ou grupos acila.

York et al. (1984) foram os primeiros a demonstrar que nonassacarídeos (XXFG) de xiloglucano (fig. 2), principal polissacarídeo hemicelulósico de dicotiledôneas, em concentrações de 10^{-8} – 10^{-9} M, podiam inibir o crescimento de hipocótilos de ervilha induzido pela aplicação de 10^{-6} M de 2,4 – D.

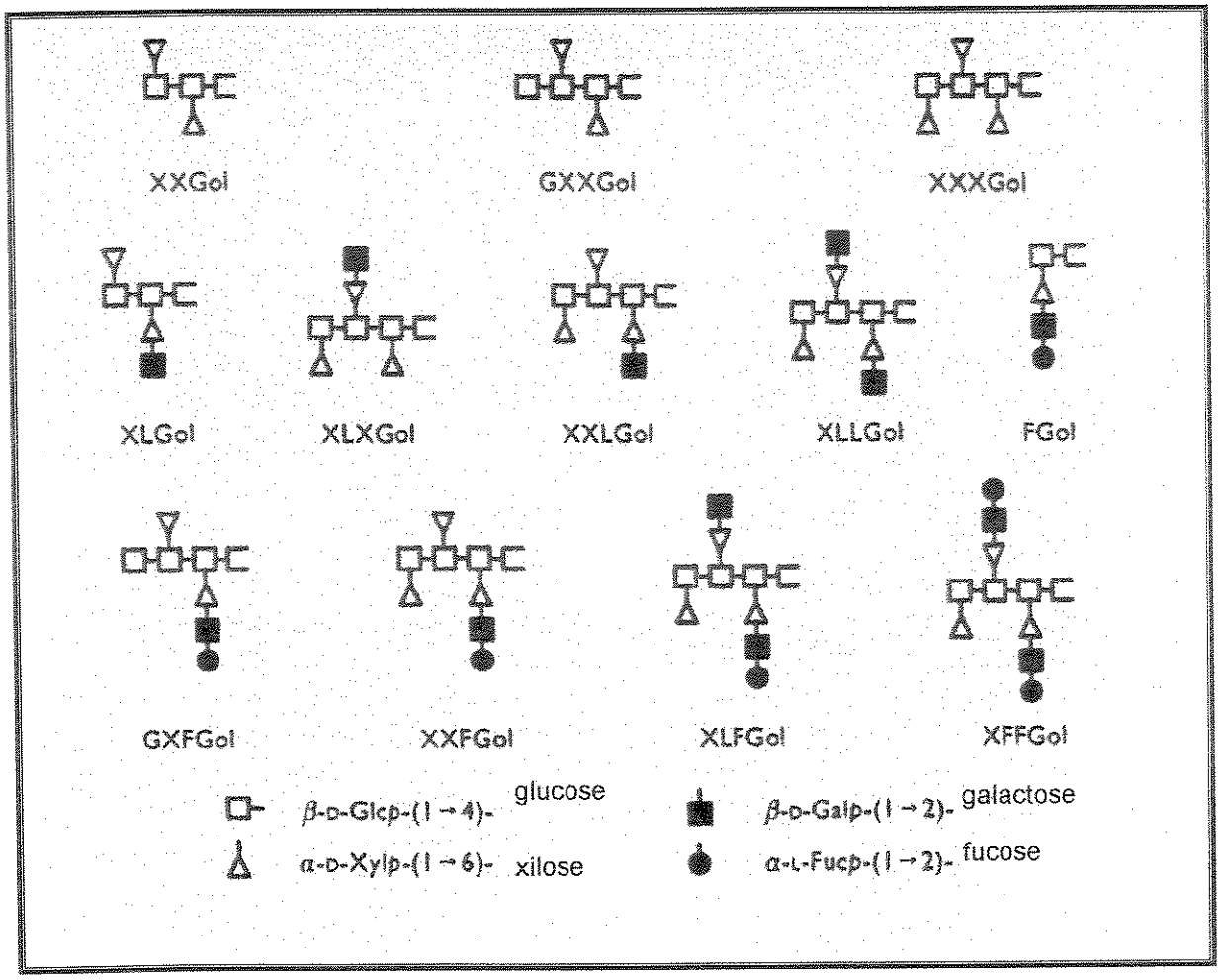


Figura 2. Alguns oligossacarídeos reduzidos provenientes do xiloglucano e que possuem atividade biológica (Albersheim et al., 1999). Nomenclatura segundo Fry et al. (1993), onde G = glucose; X = xilose; L = galactose e F = fucose.

Oligossacarídeos de pectina, por sua vez, quando aplicados a explantes de tabaco, foram capazes de induzir a formação de flores na ausência de reguladores de crescimento (Eberhard *et al.*, 1989). Alguns N-glucanos, de grau de polimerização (GP) entre 6 e 8, são capazes de regular o crescimento e o desenvolvimento em diversas espécies vegetais (Priem *et al.*, 1990 citado por Aldinton & Fry, 1993).

Auxtová et al. (1995) observaram que oligossacarídeos derivados de galactoglucomanano de *Populus monilifera,* com grau de polimerização entre 4 e 8,

apresentam atividade biológica, sendo capazes de inibir o crescimento de segmentos de caule de ervilha induzido por 2,4-D.

Além dos efeitos sobre o crescimento, algumas destas oligossacarinas, provenientes de carboidratos de parede celular de planta, têm sido descritas como sinais químicos envolvidos na indução de respostas de defesa em plantas contra predadores e patógenos (Albersheim *et al.*, 1983; Braga *et al.*, 1993). As primeiras evidências do envolvimento de oligossacarídeos de parede celular em respostas químicas de defesa vieram de estudos relativos à síntese de fitoalexinas em plantas cultivadas, infectadas por fungos. Fitoalexinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, com ação antimicrobiana, produzidos pela planta somente após o contato com microorganismos, acumulando-se rapidamente e em grandes quantidades no local da infecção (Darvill & Albersheim, 1984; Stoëssl, 1986).

Durante a colonização por fungos ou bactérias, pectinases liberadas pelo patógeno clivam ligações internas de polissacarídeos pécticos da parede celular da planta, ocasionando a liberação de fragmentos ricos em ácido galacturônico (oligogalacturonídeos). Estes têm sido descritos como oligossacarinas que induzem a produção de fitoalexinas em várias espécies vegetais (Braga *et al.*, 1993, Braga & Dietrich, 1998). Hahn *et al.* (1981) isolaram moléculas indutoras de fitoalexinas de paredes de soja e demonstraram que a atividade eliciadora residia na fração péctica. Eliciadores similares foram posteriormente isolados de culturas em supensão de tabaco, sicômoro e trigo. O componente ativo era solúvel em água, estável ao aquecimento e à hidrólise ácida parcial, de massa molecular pequena e se tornava inativo quando tratado com EPG (endopoligalacturonase). Por serem derivados do próprio hospedeiro foram classificados, por alguns autores, como eliciadores endógenos.

A relação entre o tamanho do oligogalacturonídeo (grau de polimerização) e a atividade biológica tem sido observada em eliciadores endógenos. A síntese de fitoalexinas e de lignina nas respostas de defesa restritas às regiões que rodeiam a injúria ou infecção são ativadas por oligogalacturonídeos de GP entre 10 e 14 (Nothnagel *et al.*, 1983). Já as respostas rápidas de defesa, nas quais células

localizadas próximas à infecção estão necrosadas, ocorre somente por indução causada por uma mistura de oligogalacturonídeos de GP ≥ 4 (Cervone *et al.*, 1989).

Em ensaios preliminares com sementes de *S. marginata*, foi detectada atividade indutora de fitoalexinas em extratos obtidos do endosperma (Rahal *et al.*, 1998). Foi observado que essa atividade está presente em várias fases do processo de germinação. Os resultados sugerem que, além da função de reserva e do papel no controle de entrada de água na semente, polissacarídeos do grupo dos mananos talvez possam também influenciar processos fisiológicos, por conter moléculas sinalizadoras em sua estrutura.

Nenhuma referência foi encontrada com respeito à atividade biológica de carboidratos de reserva de paredes celulares de sementes na indução de respostas de defesa em plantas.

OBJETIVOS

Considerando-se que moléculas sinalizadoras têm sido isoladas de paredes celulares primárias de diversas plantas e descritas como fragmentos dos carboidratos que as compõem e que esses oligossacarídeos agem como sinais químicos envolvidos na regulação de processos fisiológicos e na produção de substâncias de defesa contra predadores e patógenos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade indutora de fitoalexinas detectada em extratos de *S. marginata* e analisar sua possível relação com a presença de oligossacarídeos provenientes da degradação do galactomanano, durante a germinação da semente.

MATERIAL BIOLÓGICO

- sementes de *Sesbania marginata* Benth. coletadas na entrada da Secretaria da Agricultura, localizada próxima ao Instituto de Botânica, São Paulo, SP;
- sementes de soja *Glycine max* [L.] Merr. (IAC 8 e 15.2), cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, germinadas e cultivadas em casa de vegetação, a temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (14 horas de luz) durante 8-12 dias;
- esporos do fungo *Mucor ramosissimus* Samutsevitsch (URM 3106), cultivado por 8 dias em meio BDA (batata-dextrose-ágar), mantido no escuro a 25 °C.

MÉTODOS

1. Germinação das sementes

Inicialmente, os procedimentos de germinação de sementes de *S. marginata* foram realizados utilizando 350 sementes escarificadas manualmente, com o auxílio de uma lixa, distribuídas em placas de Petri (10 sementes/placa) sobre papel de filtro umedecido com 5 ml de água destilada. Estas foram mantidas em sala de germinação, sob fotoperíodo de 12 h e a 25°C. A cada 24 h, durante 7 dias, 5 placas foram retiradas da sala de germinação, totalizando assim, 50 sementes por dia. Estas foram dissecadas, separando-se endosperma+testa do eixo embrionário+cotilédones. As partes isoladas foram pesadas (para a obtenção da matéria fresca) e secas em estufa a 70°C, durante 24 h (para obtenção de matéria seca). Com isso, a extração dos açúcares solúveis (item 1.2) foi realizada com os endospermas+testas moídos. Contudo, em diversas espécies vegetais, há um alto teor de pectinas na testa de suas sementes (Western et al., 2000) e, conforme mencionado na Introdução, alguns oligossacarídeos provenientes destas moléculas possuem ação indutora de fitoalexinas. Com o intuito de diminuir a possibilidade de contaminação dos extratos de açúcares solúveis por oligossacarídeos de pectina, foram realizados também experimentos com extratos de endospermas isolados.

Para a obtenção dos endospermas isolados foram utilizadas 5000 sementes. A escarificação destas sementes foi realizada com o auxílio de uma pequena quantidade de areia colocada junto com as sementes no interior da câmara de

trituração de um moinho de bolas, porém sem a presença da esfera de aço. Através do atrito com a areia e as paredes da câmara, as sementes foram escarificadas durante 5 min. Na seqüência, as sementes foram lavadas com água destilada, secas e distribuídas em 10 bandejas (500 sementes/bandeja), com papel de filtro umedecido com 70 ml de água destilada e mantidas em câmara de germinação, sob fotoperíodo de 12 h e sob irradiação de 437 $\mu w.cm^{-2}.s^{-1}$, a 25° C. A cada 24 h, durante 5 dias, 2 bandejas foram retiradas da sala de germinação, totalizando assim, 1000 sementes por dia. Estas sementes foram dissecadas diariamente, separando-se endosperma/ testa/ cotilédone e eixo embrionário. As testas foram descartadas e o restante das partes isoladas foi pesado e seco em estufa a 70°C, durante 24 h. Somente os endospermas isolados foram utilizados para a extração de açúcares solúveis (item 2).

2. Extração de açúcares solúveis

A extração de açúcares solúveis foi realizada de duas maneiras. Para os endospermas+testa, 0,2 g deste material foram triturados e os açúcares solúveis presentes foram solubilizados em 1 ml de etanol a 80% em água, em banho-maria a 75°C, durante 5 min. Na seqüência, os extratos foram colocados em tubos eppendorf e centrifugados em micro-centrifuga Eppendorf durante 5 minutos a 2000 g. Os sobrenadantes foram recolhidos, secos sob vácuo e retomados em 1 ml de água destilada. Esta etapa foi realizada quatro vezes para cada um dos extratos, sendo os mesmos reunidos para posterior quantificação de açúcares.

Para a extração de açúcares dos endospermas isolados, cerca de 2,6 g deste material foram moídos em micromoinho e os açúcares solúveis presentes solubilizados em 10 ml de etanol a 80%, em banho-maria, a 75°C, durante 5 min. Os extratos resultantes foram colocados em tubos Sorvall e centrifugados em Sorvall super T21 durante 5 minutos a 2000 g. Esta etapa foi realizada quatro vezes para cada um dos extratos. Os sobrenadantes correspondentes a cada período foram reunidos, secos sob vácuo e retomados em 5 ml de água destilada para posterior quantificação de açúcares.

3. Quantificação de carboidratos e compostos fenólicos

A determinação de carboidratos nos extratos provenientes dos endospermas+testas e de endospermas isolados foi realizada através de ensaios colorimétricos. A quantificação de açúcares totais foi efetuada pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e a de açúcares redutores através do método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945), ambas utilizando glucose (100 µg/ml) como padrão. O teor de ácidos urônicos livres ou ligados foi avaliado pelo método do *m*-hidroxibifenil (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), sendo usada como padrão uma solução de ácido galacturônico (100 µg/ml). Foi também realizada a quantificação de compostos fenólicos nos extratos de endospermas isolados, através do método de Folin-Denis (Swain & Hillis, 1959), tendo ácido tânico (100 µg/ml) como padrão.

4. Detecção de atividade indutora de fitoalexinas

A detecção da atividade indutora de fitoalexinas dos extratos (obtidos conforme item 2) foi efetuada através do bioensaio do cotilédone de soja, descrito por Ayers et al. (1976a). Os cotilédones foram destacados de plântulas de soja crescidas por 8-12 dias, à temperatura ambiente, em fotoperíodo de 14 horas. Os cotilédones foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10 %, durante 15 min e lavados exaustivamente com água destilada estéril. Discos de 6 mm de diâmetro e cerca de 1 mm de espessura foram retirados da superfície adaxial de cada cotilédone com o auxílio de um furador de rolhas e um bisturi. Gotas de 50 µl dos extratos do 1° ao 7° dia de germinação, resultantes da extração de açúcares dos endospermas+testa e do 1° ao 5° dia dos extratos de endospermas isolados, foram aplicadas isoladamente sobre a superfície cortada de cada cotilédone. Como controle negativo, foram aplicados 50 µl água destilada em cada cotilédone e como controle positivo foram utilizados 50 µl do eliciador de esporos do fungo *Mucor ramosissimus* (extraído de acordo com Cordeiro Neto & Dietrich, 1992). Os cotilédones, em grupo de 5, foram colocados em placas de Petri, com papel de filtro umedecido com 3 ml de água destilada, e incubados no escuro a 25° C. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, totalizando 15 cotilédones/tratamento. Após 20 horas, os cotilédones foram lavados com água destilada (1 ml/ cotilédone) e as soluções resultantes filtradas e lidas em

espectrofotômetro a 286 nm. As fitoalexinas produzidas por cotilédones de soja (gliceolinas) apresentam absorbância máxima neste comprimento de onda. Os extratos de endosperma +testa foram diluídos a uma concentração final de 500 μg de açúcar total/ ml, sendo aplicados 25 μg equivalentes em carboidrato total/ cotilédone. Já os extratos provenientes dos endospermas isolados foram diluídos a uma concentração final de 100 μg de açúcar total/ ml, sendo aplicados 5 μg equivalentes em carboidrato total/ cotilédone. Essa diluição foi feita com o objetivo de se utilizar pequena quantidade de material, reservando grande parte para os ensaios de fracionamento por cromatografia em coluna.

5. Análise de carboidratos por cromatografia líquida de alta resolução (HPAEC/PAD)

Os extratos de endosperma + testa e de endospermas isolados, obtidos no item 2, foram analisados por HPAEC/PAD em sistema Dionex, em colunas Carbo-Pac PA 100 e PA 1, em programas de separação de oligossacarídeos e monossacarídeos, em eluição isocrática de NaOH 150 e 20 mM, respectivamente. As amostras analisadas para monossacarídeos foram comparadas com os tempos de eluição obtidos para padrões comerciais. No caso dos oligossacarídeos não existem padrões comerciais disponíveis para galactomanano, sendo utilizada uma solução de oligossacarídeos de "Locust bean gum" (Merck), obtidos de hidrólise com mananase de fungo *Aspergillus* sp. Através da comparação dos perfis obtidos nas análises de monossacarídeos com os perfis de oligossacarídeos, pôde-se deduzir que os picos localizados após 6 minutos de corrida corresponderam aos oligossacarídeos.

6. Caracterização da atividade biológica em extratos de endosperma+testa

A caracterização da atividade biológica foi feita utilizando-se extratos de endosperma+testa do 1°, 4° e 6° dias de germinação com diluições sucessivas, através do estabelecimento de um gradiente de concentração de açúcar, sendo ensaiados os extratos e diluições deste a 1/2, 1/4 e 1/8. Essas soluções foram ensaiadas em cotilédones de soja conforme descrito no item 4. O objetivo deste experimento foi

confirmar a detecção de atividade indutora de fitoalexinas e descartar a possibilidade de uma indução proveniente de efeito tóxico, por alta concentração de açúcar.

7. Fracionamento dos extratos de endosperma+testa por cromatografia de troca iônica

Os extratos de endosperma+testa foram aplicados em coluna de QAE-Sephadex Pharmacia. Foram utilizados extratos correspondentes aos 1°, 4° e 6° dias de germinação das sementes correspondentes às fases antes, durante e após a degradação do galactomanano. Foi aplicado 1 ml (na mesma concentração de açúcares utilizada no ensaio de soja) de cada um dos extratos em uma coluna de 5 cm x 1,5 cm e esta foi lavada com 10 ml de água desionizada, para a eluição do material não ligado à coluna. Posteriormente, a coluna foi lavada com 10 ml de tampão de bicarbonato de amônio 1 M, pH 8.0, para eluição do material preso à coluna. Foram então obtidas 2 frações de 10 ml cada. Essas frações foram liofilizadas, retomadas em 1 ml de água destilada e aplicadas em cotilédones de soja, para avaliação da atividade indutora (item 4).

8. Cromatografia em camada delgada dos extratos de endospermas isolados

Os extratos de endospermas isolados (item 2) foram submetidos à cromatografia de camada delgada em placas de sílica-gel Merck, de 0,25 mm de espessura, com dimensões de 20 x 20 cm, para análise da presença de oligossacarídeos. Nas placas, foram aplicados 100 μg equivalentes de açúcar total de cada um dos extratos de endospermas isolados. O sistema de solventes utilizado foi o n-propanol: nitrometano: água (5:2:3 v/v/v), sendo que cada uma das placas foi desenvolvida 3 vezes neste sistema. A revelação foi feita com uma solução 5% de ácido sulfúrico p.a. em etanol e com ftalato de anilina (Fry, 1988) e aquecimento a 110°C.

9. Cromatografia em coluna de Bio Gel P-2 dos extratos de endospermas isolados

Com o objetivo de isolar os oligossacarídeos presentes nos extratos de endospermas, foi utilizada cromatografia de exclusão molecular em coluna de Bio Gel

P-2 (1,5 x 75 cm) com volume de aproximadamente de 132 ml. A calibração da coluna foi realizada com soluções de Blue Dextran, maltoheptaose, estaquiose e manose. Os extratos de endospermas isolados foram aplicados na coluna à concentração de 12 mg/ml. O eluente utilizado foi água destilada e 100 frações de 2,5 ml foram coletadas. As frações foram liofilizadas e quantificadas quanto ao seu conteúdo de açúcares totais (item 3) e utilizadas para ensaio de indução de fitoalexinas (item 10).

10. Detecção de atividade indutora de fitoalexinas nas frações da coluna de Bio Gel P-2

Com a finalidade de reduzir a quantidade de material necessária ao ensaio de indução, as frações obtidas no item 9 foram analisadas quanto a sua atividade indutora de fitoalexinas utilizando-se hipocótilos de soja como material teste, conforme micro-ensaio descrito por Gómez et al. (1994). Para isso, segmentos de hipocótilos de 4 cm de comprimento foram obtidos de plântulas de soja estioladas, crescidas por 8 dias, à temperatura de 26 ± 2°C, no escuro. Com o auxílio de um bisturi, foram feitas 5 incisões de 2 mm de comprimento por 1 mm de profundidade em cada segmento. Três segmentos foram presos com o auxílio de uma agulha de injeção e colocados em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com 4 ml de água destilada. Cada incisão foi preenchida com 5 µl de amostra a ser analisada. Os controles utilizados neste experimento foram água destilada (controle negativo) e eliciador de *Mucor ramosissimus* (controle positivo). Todos os ensaios foram feitos em triplicata totalizando 3 hipocótilos/tratamento. Após 20 horas, os hipocótilos foram lavados com água destilada (2,5 ml/ hipocótilo) e as soluções resultantes filtradas e lidas em espectrofotômetro a 286 nm.

11. Hidrólise ácida das frações provenientes da coluna de Bio Gel P-2

Duas frações provenientes da coluna de Bio Gel P-2, que apresentaram atividade indutora de fitoalexinas (item 10), foram submetidas a hidrólise ácida com ácido trifluoracético (TFA) 2N, em autoclave, durante 30 min. Em seguida foram secas sob vácuo e retomadas com 500 µl de água desionizada. Posteriormente, as amostras

foram analisadas por HPEAC/PAD, em programas para detecção de monossacarídeos (item 5).

RESULTADOS

Na figura 3 são apresentados os dados de matérias seca, fresca e massa de água nas partes isoladas, durante a germinação das sementes de *S. marginata*. Pela figura 3A, nota-se que do 1° para o 2° dia de germinação a massa fresca dos endospermas+testa manteve-se praticamente constante, declinando a partir de então. Os cotilédones, por sua vez, mostraram, desde o 1° dia de germinação, um aumento de massa fresca, que se manteve até o 5° dia, quando 100% das radículas já haviam rompido a testa das sementes (fig. 3A). Estes dados revelam que o eixo embrionário+cotilédone já no 1° dia de germinação, absorvem água, uma vez que, observando a figura 3C nota-se claramente que ocorre aumento na massa de água por parte destes tecidos nesse período.

Observando a figura 3B, nota-se que, a partir do 2° dia de germinação, a matéria seca dos endospermas começou a ter uma diminuição bastante acentuada que foi acompanhada por um incremento na massa do eixo embrionário+cotilédone. Estes resultados sugerem que, a partir do 2° dia de germinação, ocorre a degradação do galactomanano, cujos produtos da hidrólise são absorvidos pelo embrião, determinando um ganho de massa por parte do cotilédone e a subseqüente diminuição observada no endosperma, conforme já reportado por Buckeridge & Dietrich (1996). A quantificação de açúcares no endosperma (fig. 4) reforça essa sugestão, uma vez que entre os 2° e 3° dias de germinação foram encontrados os maiores teores de carboidratos, representados em sua maioria por oligossacarídeos. Pode-se notar também que o teor de ácidos urônicos presente nos extratos é muito pequeno quando comparado ao de oligossacarídeos (fig. 4).

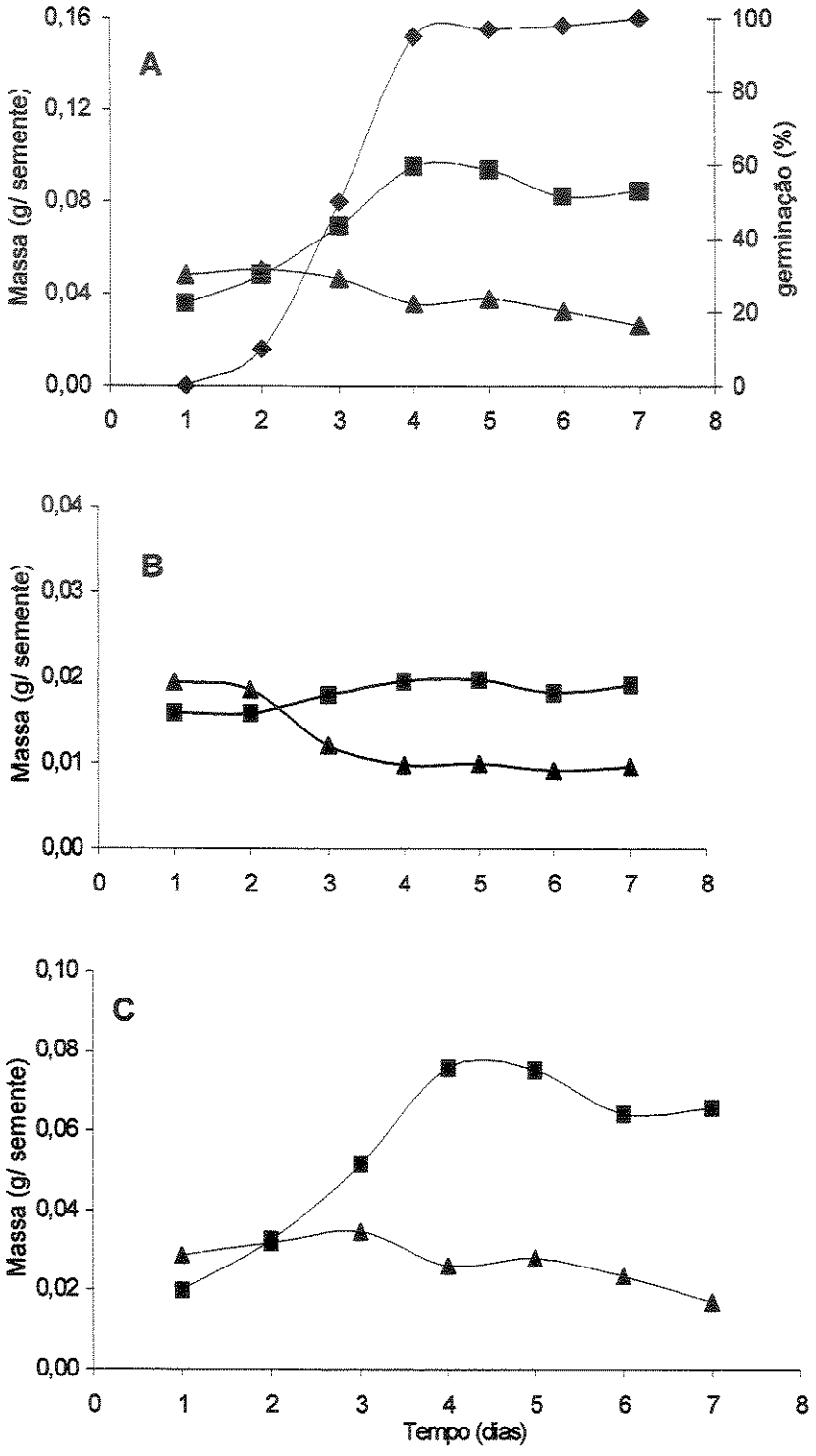


Figura 3. Matérias fresca (A) e seca (B) e massa de água (C) durante a germinação das sementes de *S. marginata*.

▲- endosperma + testa; ■ - eixo embrionário+cotilédone e ◆ - % de germinação.

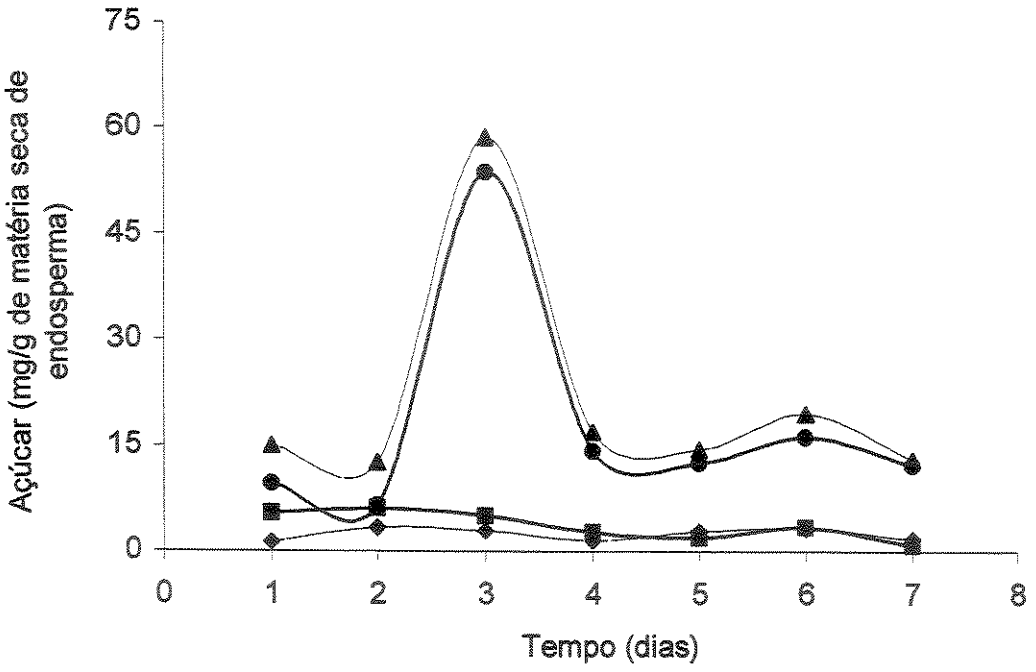


Figura 4. Variação no conteúdo de carboidratos nos extratos de endosperma+testa durante a germinação de sementes de *S. marginata*.
▲ - açúcares totais, ■ - açúcares redutores, ◆ - ácidos urônicos e ● - oligossacarídeos (calculados pela diferença entre açúcares totais e redutores).

Através do bioensaio em cotilédones de soja, feito com os extratos brutos de endosperma + testa de sementes de *S. marginata*, foi observada resposta indutora de fitoalexinas durante todo o período de germinação sendo, entretanto, esta mais intensa do 4° ao 6° dias (fig. 5), não diferindo daquela observada pela indução com o eliciador de *M. ramosissimus*. Conforme mostrado na figura 4, nestes dias, os extratos de endosperma+testa não possuem altos teores de carboidratos, como no 3° dia, porém eles são um pouco maiores após a degradação do galactomanano (4°–7° dias), quando comparados ao 1° dia.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

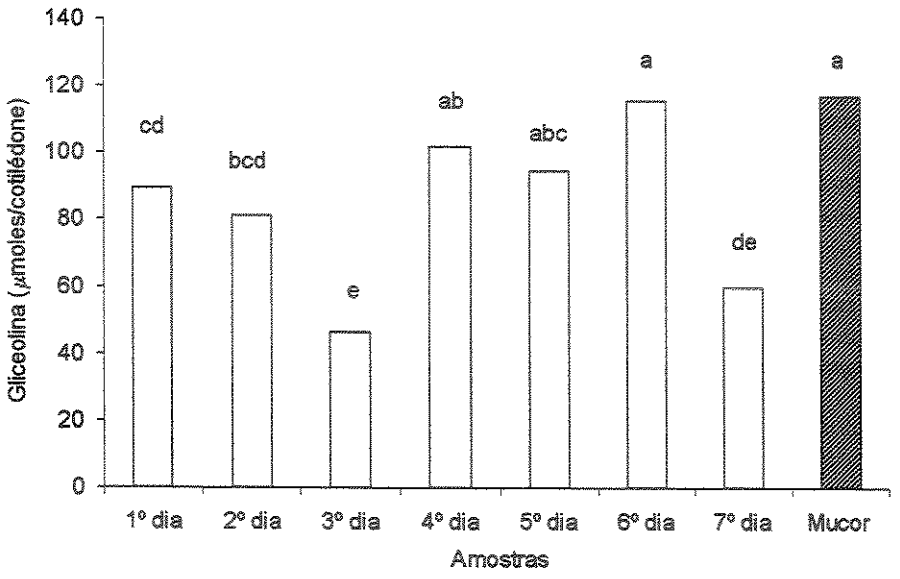


Figura 5. Atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja, obtida pela aplicação de extratos de endosperma+testa de sementes de *S. marginata*. As letras comparam as médias por Tukey a 5%. Os valores relativos à água (controle) já foram descontados. Mucor corresponde ao eliciador (controle positivo) extraído de esporos do fungo *M. ramosissimus.*

Extratos do 3° ao 6° dias de germinação de sementes de *S. marginata,* correspondentes ao período de degradação do galactomanano, foram analisados por HPAEC/PAD em programas para detecção de monossacarídeos e oligossacarídeos (fig. 6). Essas análises revelaram a presença de galactose e manose nos 4° e 5° dias de germinação (fig. 6A) e de oligossacarídeos, cujo perfil variou durante a germinação (fig. 6B).

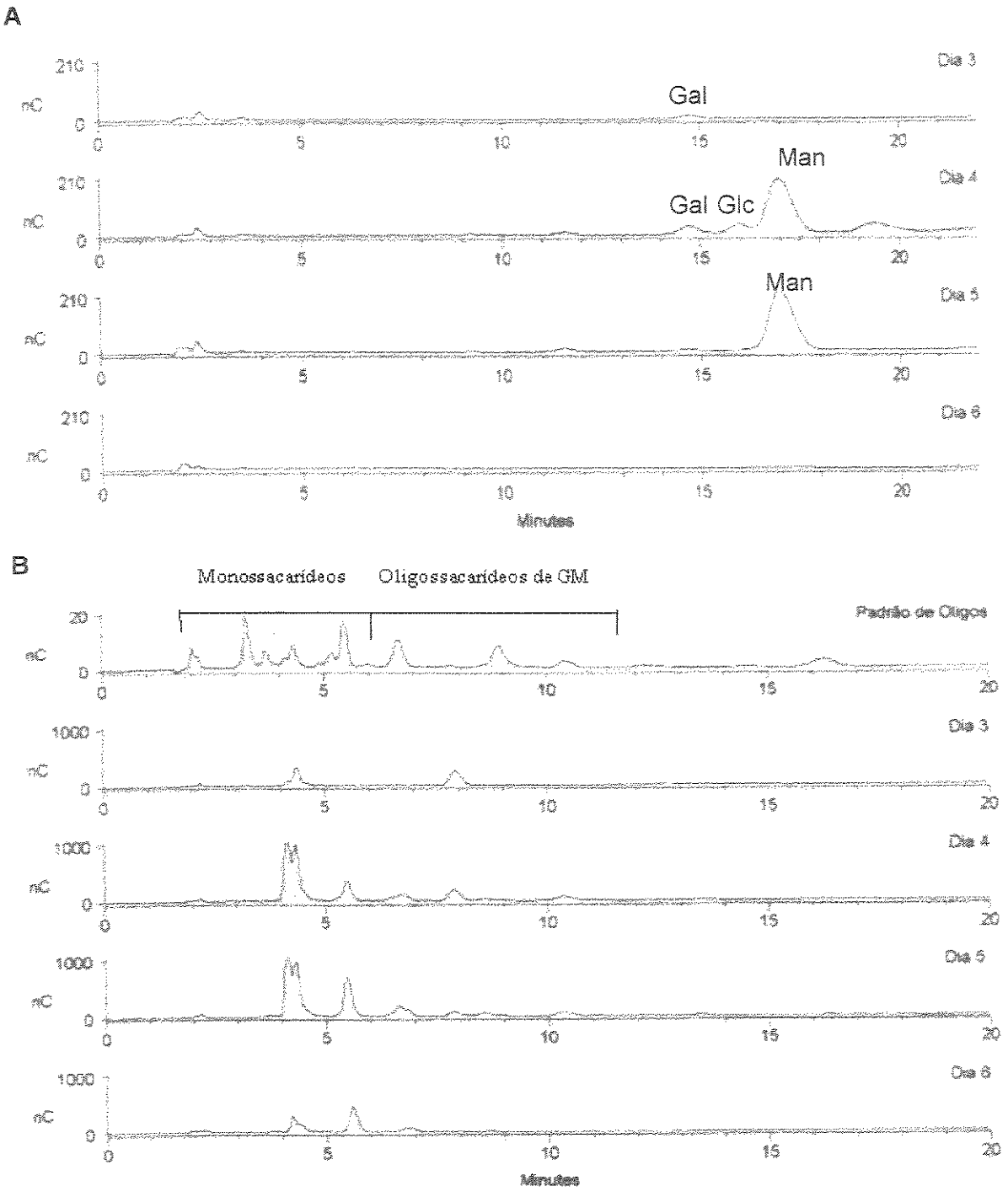


Figura 6. Perfil de eluição dos extratos de endospermas+testa de *S. marginata* analisados em HPAEC/PAD em programas para detecção de monossacarídeos (A) e oligossacarídeos provenientes da degradação do galactomanano (B). O padrão de oligossacarídeos corresponde ao hidrolisado de "locust-bean gum". Para os monossacarídeos foi utilizada a coluna PA 1 em eluição isocrática de NaOH 20 mM e para a análise de oligossacarídeos a Carbo-Pac PA 100, em NaOH 150 mM. Gal-galactose, Glc–glucose e Man–manose.

Com o objetivo de caracterizar o efeito indutor observado em soja como atividade biológica real, sem que houvesse dúvidas de indução por efeito tóxico, foi realizado um ensaio utilizando extratos de endosperma+testa diluídos. Foram selecionados extratos do 1°, 4° e 6° dias de germinação, por apresentarem maior atividade e por representarem períodos antes, durante e após a mobilização do galactomanano (fig. 7). Observando-se a figura 7, pode-se notar que a atividade indutora de fitoalexinas aumenta à medida que a concentração de açúcares dos extratos aumenta, porém, sem que seja atingido o ponto de saturação da atividade indutora. A utilização do log da concentração de extrato aplicada revelou o padrão típico esperado de atividade biológica apenas no extrato do 1° dia, confirmando a existência de relação concentração/atividade e descartando, para esse extrato, a possibilidade de indução de fitoalexinas por efeito tóxico, devida a altas concentrações de açúcar aplicadas nos cotilédones (fig. 7A, inserto). Para os demais extratos essa relação típica não foi observada, embora o efeito tóxico também não foi observado. Pode-se notar também que as inclinações das retas apresentadas na figura 7 são diferentes, sendo que no extrato do 6° dia de germinação, a inclinação da reta é menor que a dos extratos do 1° e 4° dias. Esse resultado sugere que o extrato do 6° dia de germinação possui menor potencial indutor de fitoalexinas como conseqüência da provável menor quantidade de moléculas indutoras em sua composição. Portanto, os extratos obtidos de sementes que estavam em uma fase anterior à degradação do galactomanano (1° dia) e aquele do 4° dia, durante a degradação, parecem possuir maior potencial indutor do que os extratos obtidos de sementes que já haviam degradado o galactomanano (6° dia), embora nenhuma diferença significativa de atividade tenha sido observada entre eles no ensaio mostrado na figura 5.

Conforme já demonstrado por vários autores (Hahn et al., 1981; Albersheim et al., 1983; Darvill et al., 1992), oligogalacturonídeos mostram atividade indutora de fitoalexinas mesmo em quantidades muito pequenas, não sendo possível descartar a possibilidade de sua presença nos extratos de endosperma+testa de sementes de *S. marginata*. Assim, os mesmos extratos da curva dose-resposta foram submetidos à cromatografia em coluna de troca iônica em gel de QAE-Sephadex, o que poderia descartar a possibilidade de que os oligogalacturonídeos fossem responsáveis pela

atividade indutora observada, uma vez que, por possuírem carga negativa, essas substâncias ligam-se ao gel.

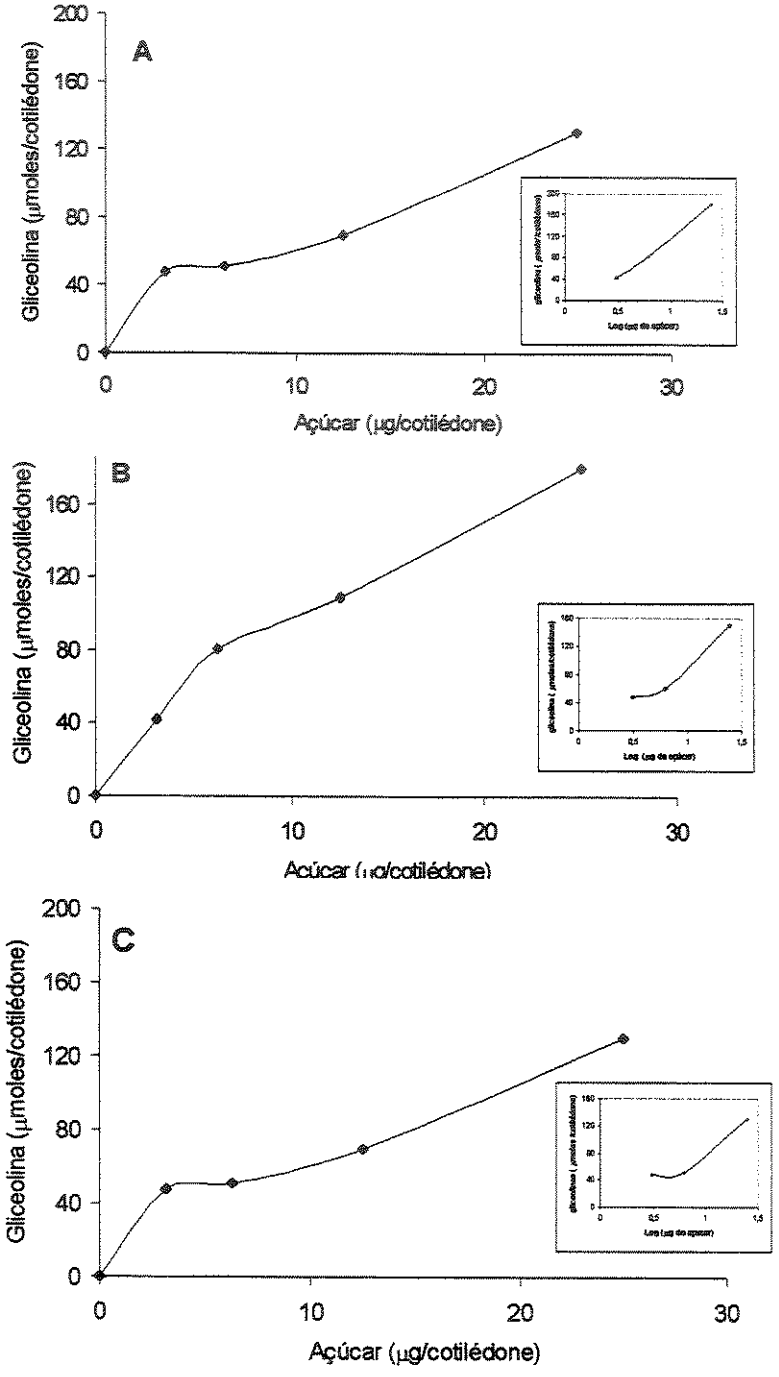


Figura 7. Ensaio em cotilédones de soja utilizando extratos do 1° dia (A), 4° dia de germinação (B) e 6° dia de germinação (C) em diluição em série. Os insertos representam a atividade indutora plotada em função do log da quantidade de açúcar aplicada por cotilédone.

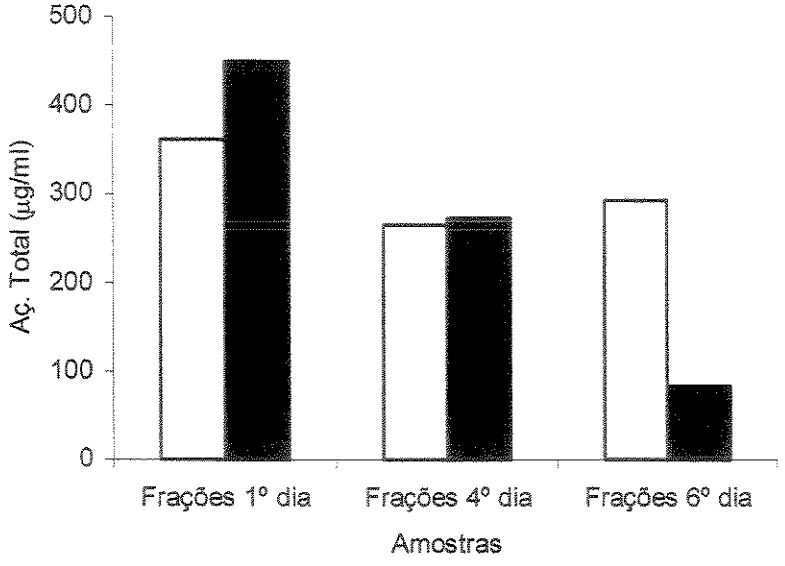


Figura 8. Quantidade de açúcar total nos extratos provenientes da coluna de QAE-Sephadex. ■ - material retido na coluna e □ - material não retido na coluna.

Pela quantificação de açúcar total foi observado que no extrato do 1° dia de germinação maior quantidade do material ficou retido na coluna, em comparação com a quantidade eluída com água. Já nos extratos do 4° dia de germinação, a quantidade de material não retido à coluna e de material retido, foi praticamente a mesma. No extrato de 6° dia de germinação, a maior parte do material não ficou presa à coluna (fig. 8). Estas frações foram liofilizadas, retomadas em água e submetidas a ensaio em cotilédones de soja (fig. 9).

A atividade indutora de fitoalexinas referente aos 1°, 4° e 6° dias de germinação foi maior quando foram utilizadas as frações que ficaram retidas na coluna de QAE-Sephadex em comparação com aquelas eluídas com água. Esses dados sugerem que tanto oligossacarídeos de galactomanano (não ligados ao gel da coluna QAE-Sephadex), quanto aqueles carregados negativamente (oligogalacturonídeos) podem estar contribuindo para a atividade eliciadora dos extratos de endosperma+testa de *S. marginata,* embora maior atividade tenha sido verificada no material retido ao gel da coluna.

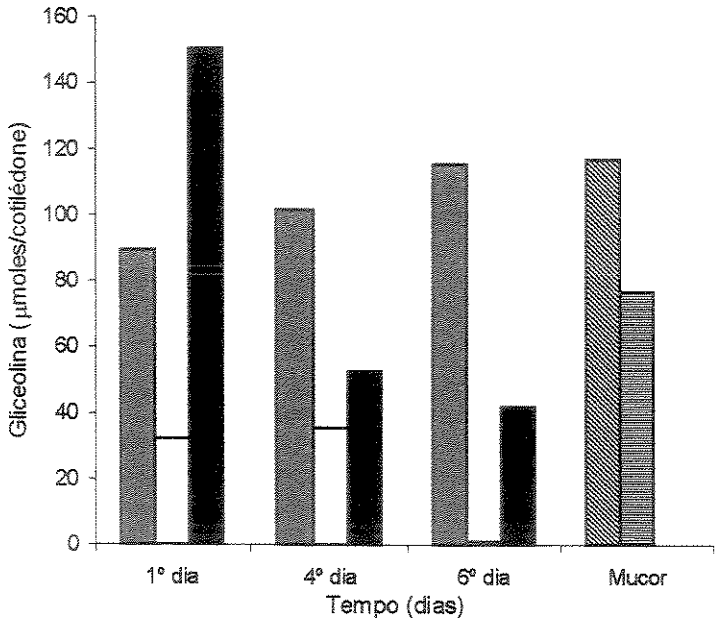


Figura 9. Atividade indutora de fitoalexinas das frações dos extratos do endosperma+ testa de *S. marginata* após cromatografia de troca iônica em QAE-Sephadex. ▒ - extratos brutos de endosperma+testa, □ - fração não retida na coluna, ■ - fração retida na coluna, ▨ -eliciador de *M. ramosissimus* ensaiado juntamente com os extratos brutos endosperma +testas e▤ - eliciador (controle positivo) ensaiado juntamente com as amostras após coluna de QAE Sephadex. Os valores relativos à água já foram descontados.

Visando diminuir a possibilidade de contaminação dos extratos de açúcares solúveis por oligossacarídeos de pectina provenientes da testa da semente, foram realizados também experimentos com extratos de endospermas sem a presença da testa. Os resultados mostrados a seguir se referem a esses extratos.

O acompanhamento das variações de massas fresca e seca durante o processo de germinação das sementes de *S. marginata* (fig. 10) teve como resultado perfis semelhantes àqueles já mostrados anteriormente (fig. 3), demonstrando existir um padrão de germinação no qual os cotilédones ganham massa e os endospermas perdem. As diferenças nos valores das massas, quando se comparam as figuras 3 e 10, se devem à eliminação das testas que haviam sido consideradas nas medidas da figura 3.

Pela figura 10A, nota-se que até o 2° dia de germinação, houve aumento na matéria fresca dos endospermas. Do 2° para o 3° dia, não houve alteração significativa em sua massa, sendo observada, a partir deste ponto, uma queda acentuada. Este aumento de massa fresca, ocorrido nos dois primeiros dias de germinação, pode ser explicado por um efeito da embebição de água, já que o galactomanano presente no endosperma possui capacidade de reter água (Reid, 1971). Essa alteração não foi observada quando foram utilizados endosperma+testa (fig. 3), sugerindo que a estabilização na entrada de água foi retardada neste segundo experimento, em relação ao primeiro. Os embriões, por sua vez, iniciaram um aumento de massa fresca, a partir do 1° dia de germinação, que se manteve até o 5° dia (fig. 10A), semelhante ao mostrado na figura 3A. A figura 10C mostra que aumento acentuado na massa de água por parte dos embriões já a partir do 1° dia de germinação e a paralela queda de massa de água nos endospermas. A quantidade de água que é absorvida pelo embrião é muito maior que a quantidade perdida pelo endosperma durante toda a germinação.

Observando a figura 10B, nota-se que entre o 2° e 3° dias de germinação, a massa seca dos endospermas começou a ter uma diminuição bastante acentuada, que prosseguiu até o 5° dia de germinação. Por outro lado, a massa seca dos cotilédones iniciou um aumento entre o 3° e 4° dia de germinação, que se manteve até o 5° dia (fig. 10B), possivelmente como resultado da incorporação do material proveniente da degradação do galactomanano no endosperma, conforme anteriormente mencionado. No 6° dia de germinação, o endosperma já havia sido totalmente degradado, tendo desaparecido completamente. Isso significa que as medidas relativas ao 6° e 7°dias de germinação mostradas na figura 3 não são representativas do endosperma, mas sim das testas das sementes.

O perfil relativo às quantidades de açúcares totais solúveis presentes nos extratos etanólicos de endospermas do 1° ao 5° dia (fig. 11) é semelhante àquele apresentado anteriormente (fig. 4), porém defasado, uma vez que a maior quantidade de açúcares foi encontrada no 4° dia de germinação. Em comparação com a figura 4, nota-se, pela figura 11, que a maior quantidade de carboidratos foi extraída, possivelmente por terem sido utilizados endospermas isolados. Além disso, a proporção de oligossacarídeos foi bem menor em relação ao total de carboidrato extraído, devido

a uma maior quantidade de açúcares redutores presentes no extrato (fig. 11). Os carboidratos totais, assim como os açúcares redutores e os oligossacarídeos (determinados pela subtração entre a quantidade de açúcares totais e redutores), mostraram um aumento em seus teores a partir do 2º dia de germinação, tendo entre o 4° e 5° dias de germinação, uma acentuada queda.

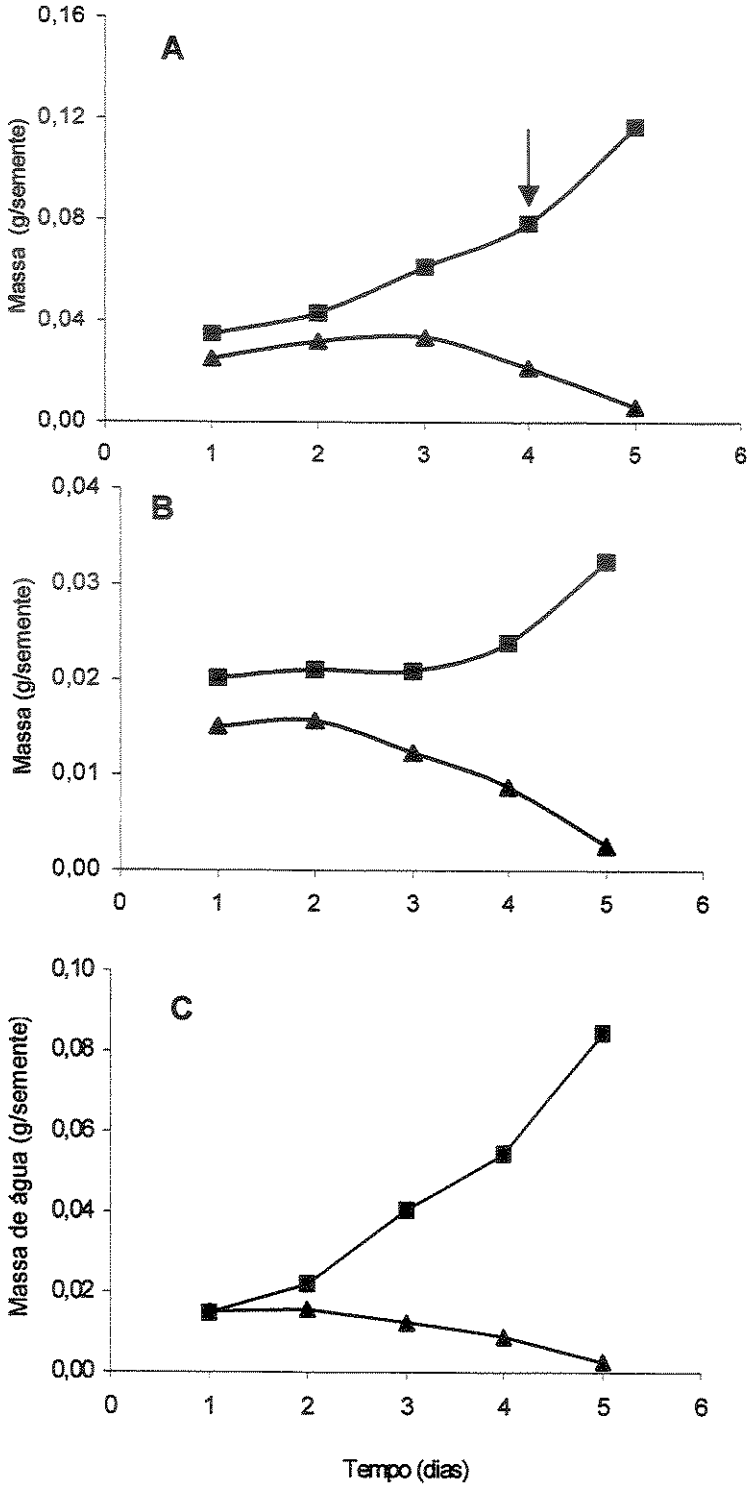


Figura 10. Massas fresca (A) e seca (B) e massa de água (C) durante a germinação das sementes de *S. marginata*.
▲ endosperma, ■ - cotilédones + eixo embrionário. A seta indica a germinação de 100 % das sementes.

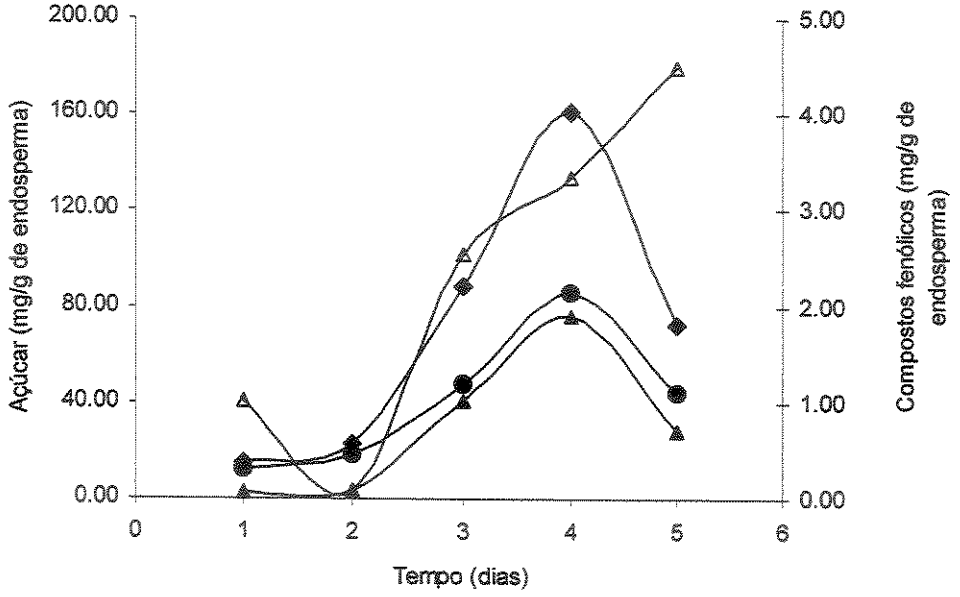


Figura 11. Variação no conteúdo de carboidratos e compostos fenólicos nos extratos de endospermas durante a germinação de sementes de *S. marginata*. ◆- açúcares totais; ▲ açúcares redutores; ● - oligossacarídeos (calculados pela diferença entre açúcares totais e redutores) e Δ - compostos fenólicos.

A explicação para a presença de oligossacarídeos no extrato do 1º dia é a hidrólise de uma família de oligômeros chamada de série rafinósica, que ocorre em algumas sementes de leguminosas (Dey, 1980; Buckeridge & Dietrich, 1996) e que é hidrolisada no início da germinação, auxiliando na nutrição do embrião, mesmo antes da degradação do galactomanano. Essa série tem como base a molécula de sacarose, à qual são adicionados, em uma série homóloga, resíduos de galactose.

Devido à presença de compostos fenólicos nos extratos de endospermas isolados, não foi possível a detecção de ácidos urônicos (fig.11). É provável que os ácidos urônicos mostrados na figura 4 sejam provenientes das testas das sementes, e como estão em maior proporção, a interferência dos compostos fenólicos ficou mascarada pela intensa coloração produzida pela reação desses açúcares-ácidos.

Os compostos fenólicos nos endospermas isolados apresentaram aumento ao longo do processo de germinação. Como essas substâncias normalmente possuem

papel de proteção, poderia se especular sobre uma possível função de defesa associada ao aumento observado.

Objetivando-se analisar qualitativamente os açúcares presentes nos extratos etanólicos de endosperma, esses foram submetidos à análise por HPAEC/PAD em programas para detecção de monossacarídeos (fig. 12).

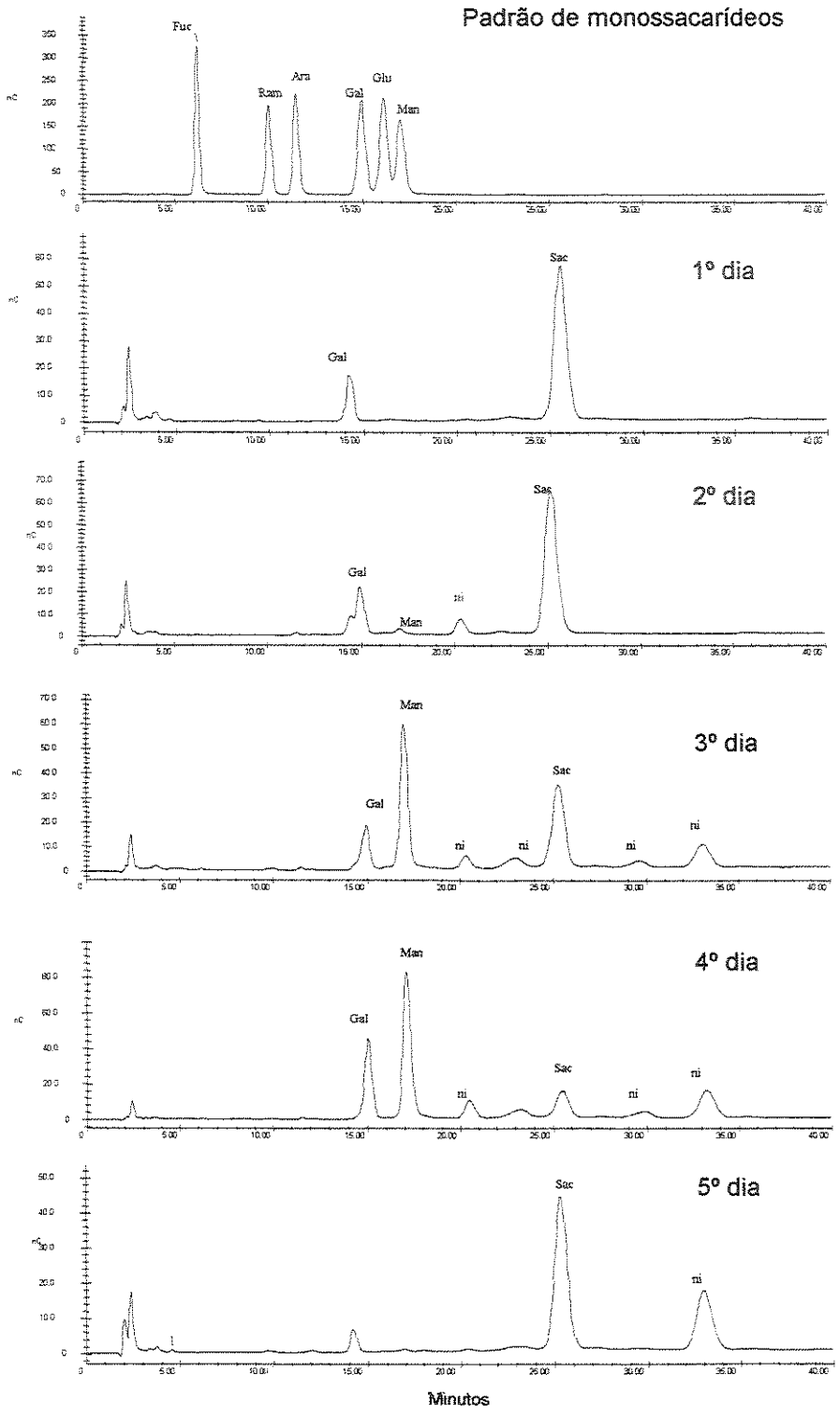


Figura 12. Perfis de eluição dos extratos de endospermas de *S. marginata* analisados em HPAEC/PAD em programas para detecção de monossacarídeos.Fuc=fucose; Ram= ramnose; Ara= arabinose; Gal= galactose; Glc=glicose; Man= manose; Sac = sacarose; ni = não identificado.

As análises por HPAEC/PAD (fig. 12) dos extratos de endosperma de *S. marginata* revelaram a presença de monossacarídeos durante toda a germinação, com aumento ao longo do processo. Pode-se notar que à medida que a germinação das sementes foi ocorrendo, o número de monossacarídeos eluídos foi aumentando. A partir do 1° dia de germinação, foi observada a presença de galactose e do dissacarídeo sacarose, sendo possivelmente produtos da degradação de oligossacarídeos da série rafinósica, conforme sugerido anteriormente.

Tanto no extrato de endospermas isolados (fig. 12), quanto no extrato de endosperma + testa (fig. 6A), no 5° dia de germinação, foi observada a queda acentuada de galactose e manose, caracterizando assim, o término do processo de degradação do polissacarídeo, e a conseqüente translocação para o embrião em crescimento.

Os perfis de oligossacarídeos variaram muito durante toda a germinação, com predominância de oligossacarídeos nos 1°, 2° e 5° dias de germinação (dados não mostrados). A presença de oligossacarídeos já no 1° e 2° dias de germinação, conforme já mencionado, se deve à presença de membros da série rafinose, componente principal de uma família de oligossacarídeos presentes em algumas leguminosas (Dey, 1980; Buckeridge & Dietrich, 1996), os quais auxiliam a planta em seu estabelecimento inicial, sendo degradados no início da germinação (Buckeridge et al., 1995).

A atividade indutora de fitoalexinas foi observada em todos os extratos de endosperma, mas principalmente nos 1°, 2° e 5° dias de germinação (fig. 13). Conforme mostrado na figura 11, nesses dias, os extratos de endosperma não possuem grande quantidade de açúcares solúveis, como observado para os outros extratos. Quando foram ensaiados os extratos de endosperma +testa (Fig. 5), estes se mostraram mais ativos nos 1°, 4°, 5° e 6° dias, mostrando uma certa semelhança entre os dois resultados obtidos. Entretanto, no ensaio mostrado na figura 13, as atividades foram muito inferiores àquelas detectadas para o eliciador *Mucor ramosissimus*. Cabe ressaltar, entretanto, que as quantidades em equivalente de açúcar total aplicadas nesse ensaio foram de 5 μg/cotilédone de soja, ou seja, 5 vezes menores do que o

inicialmente utilizado (vide fig. 5) o que certamente explica a menor produção de gliceolinas aqui observada.

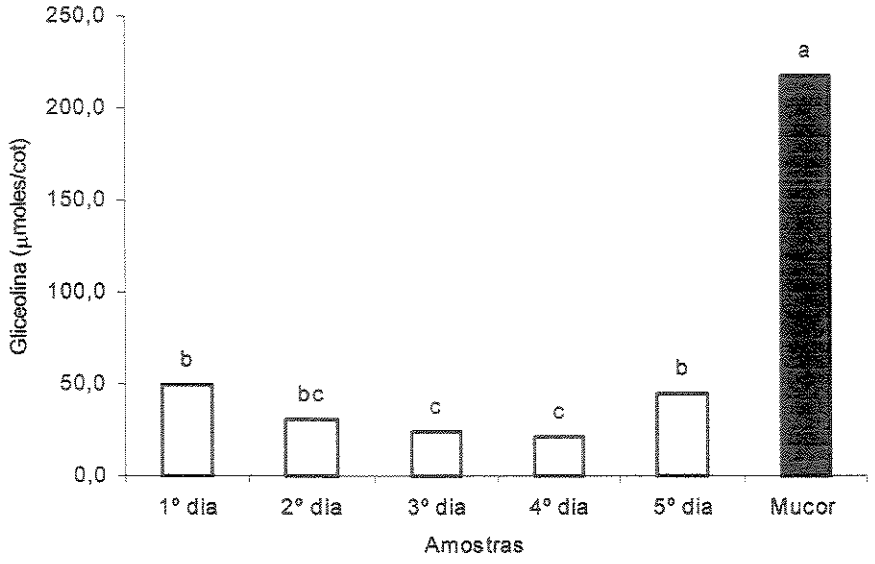


Figura 13. Atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja, obtida pela aplicação de extrato brutos de endosperma de sementes de *S. marginata*. As letras comparam as médias por Tuckey a 5% (c.v = 4,9%). Os valores relativos à água (controle) já foram descontados. Mucor corresponde ao eliciador (controle positivo), extraído de esporos de fungo *M. ramosissimus*.

No 4° dia de germinação, quando a maior quantidade de açúcares solúveis totais foi detectada nos endospermas (fig. 11), os resultados apresentados no ensaio em cotilédones de soja apontaram uma baixa atividade indutora de fitoalexinas (fig. 13). Por outro lado, nos extratos provenientes do 1°, 2° e 5° dias de germinação, a atividade indutora de fitoalexinas foi mais alta. Para o 5° dia, estas análises revelaram a existência de oligossacarídeos de galactomanano, sugerindo que estes oligômeros poderiam estar exercendo função de eliciadores detectados no ensaio de cotilédones de soja (fig. 12).

Como já foi visto, a degradação do galactomanano teve início entre o 2° e 3° dia de germinação. Sendo assim, o extrato do 1° dia de germinação não possui oligossacarídeos de galactomanano que possam estar induzindo a eliciação de fitoalexinas nos cotilédones de soja. Isto sugere que outros oligossacarídeos, de composição ainda desconhecida, são responsáveis pela atividade indutora observada.

Analisando-se a figura 14, para qual foi calculada a atividade específica dos extratos de endosperma, pode-se notar que nos extratos do 1° e 5° dias de germinação ela mostrou-se alta.

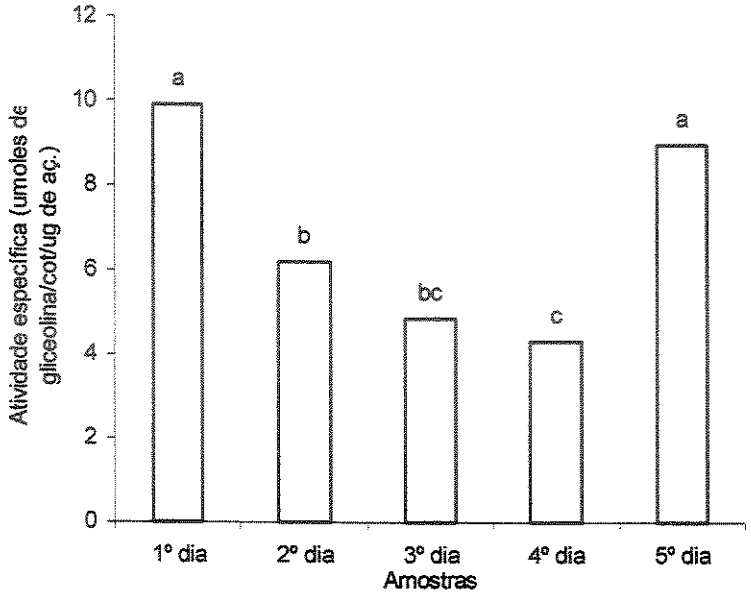


Figura 14. Atividade indutora específica dos extratos de endospermas do 1° ao 5° dia de germinação. Essa atividade foi calculada dividindo-se os valores de atividade indutora total da fig. 13, pela quantidade de açúcar total aplicada por cotilédone (5 μg). As letras comparam as médias por Tuckey a 5%.

A elevada atividade específica no extrato referente ao 1° dia de germinação se deve, possivelmente, à existência de uma quantidade proporcionalmente menor de açúcares neste extrato. Os oligossacarídeos ativos, nesse caso, não são derivados do galactomanano, já que este começa a ser degradado a partir do 2° dia de germinação. Por outro lado, o extrato do 5° dia possui maior quantidade relativa de açúcares totais, em relação ao carboidrato total existente no 1° dia de germinação, porém tem atividade estatisticamente semelhante a ele (fig. 14). Isso significa que neste extrato deve existir, proporcionalmente, maior teor de oligossacarídeos indutores do que no extrato do 1° dia de germinação.

As cromatografias em camada delgada dos extratos de endosperma revelaram a presença de oligossacarídeos de galactomanano nos extratos de endosperma (fig. 15A), além de manose e galactose em alguns dias do processo da

germinação (figs. 15A e B). Os resultados da figura 15A sugerem que alguns desses oligossacarídeos possam ser moléculas formadas de 2 resíduos de manose (manobiose), 3 de manose (manotriose), 2 resíduos de manose e 1 resíduo de galactose, 3 de manose e 1 de galactose e 5 de manose e 2 de galactose. É interessante notar que, à medida que a germinação ocorre, cada um dos extratos de endosperma sofre alterações na composição de oligossacarídeos, ocorrendo o desaparecimento de manchas de GP maior e o aparecimento de outras de GP menor. Exemplo disso é o oligossacarídeo de GP similar à manotriose do extrato proveniente do 1° dia de germinação. No extrato do 2° dia, este oligossacarídeo mostra uma diminuição acentuada. Nos extratos do 3°, 4° e 5° dias aparece um oligossacarídeo de GP menor, composto possivelmente de 2 resíduos de manose. Estes resultados ilustram o processo de degradação do polissacarídeo de reserva, confirmando igualmente os resultados obtidos na análise por HPAEC/PAD (fig. 12).

A figura 15B revela com clareza que extratos de endosperma do 1° dia de germinação possuem apenas um tipo de monossacarídeo (galactose). A partir do 2° dia, os extratos passaram a ter a presença também de manose. Esses dados estão de acordo com os da na figura 12, que demonstra que as análises em HPAEC/PAD revelaram a presença destes monossacarídeos provenientes da degradação da série rafinósica e do início da degradação do galactomanano.

Visando obter grandes quantidades de oligossacarídeos purificados, os extratos de endospermas isolados foram diluídos a 12 mg/ml e submetidos à eluição em coluna de Bio Gel P-2. A escolha desta resina foi feita pois a maioria dos oligossacarídeos detectados em cromatografia de camada delgada possuía GP entre 2 e 8, aproximadamente. A resina Bio Gel P2 tem eficácia na separação de moléculas de 100 a 1800 Da. A coluna utilizada foi calibrada com padrões de manose, estaquiose, maltoheptaose e Blue Dextran (Sigma), obtendo-se R^2= 0,981 (dados não mostrados).

Após a coleta das frações, estas foram submetidas à dosagem de açúcares totais, obtendo-se os perfis cromatográficos da figura 15.

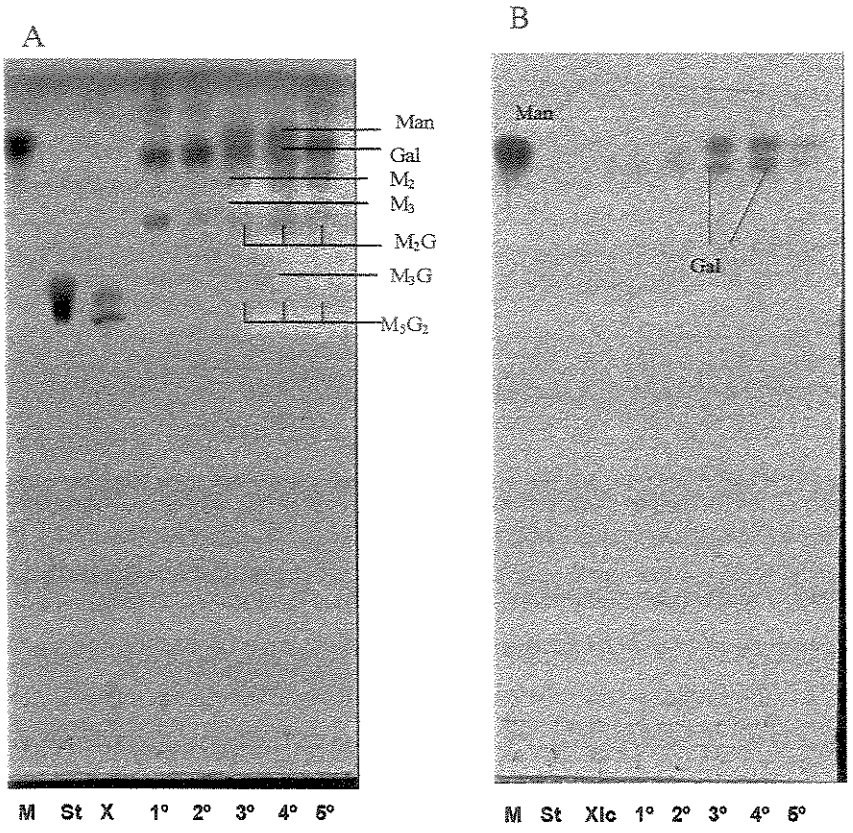
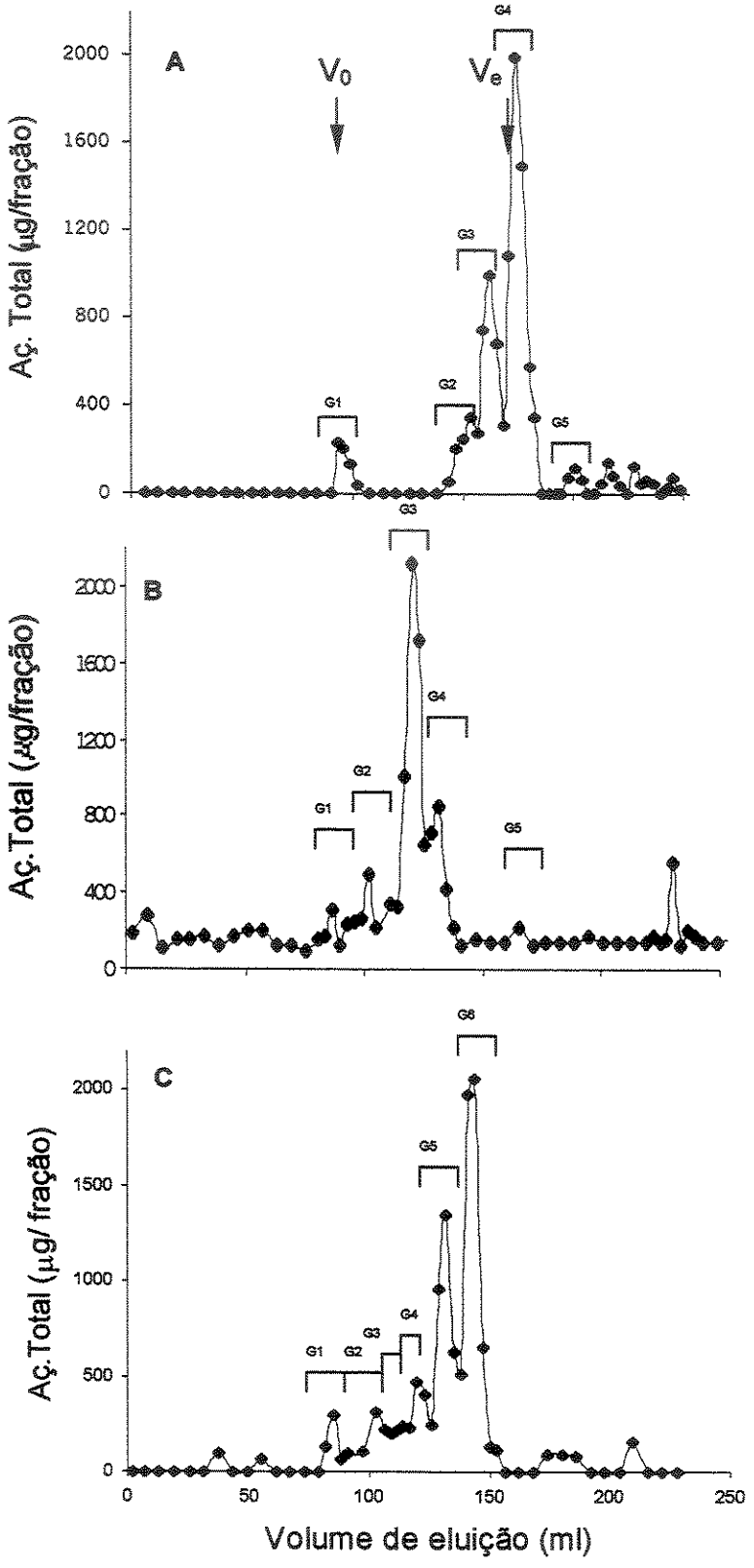


Figura 15. Cromatogramas em camada delgada com revelação por ácido sulfúrico 5% em etanol (A) e fitalato de anilina (B). M = manose (monossacarídeo); St = estaquiose (tetrassacarídeo); Xlc = oligossacarídeo de xiloglucano de sementes de *Copaífera langsdorffii* (octassacarídeo) e extratos etanólicos dos endospermas de 1°, 2°, 3°, 4° e 5° dias de germinação. Os oligossacarídeos e monossacarídeos encontrados parecem ser: Man = manose; Gal = galactose; M_2 = manobiose ; M_3 = manotriose; M_2G = 2 resíduos de manose e 1 de galactose; M_3G = 3 resíduos de manose e 1 de galactose; M_5G_2 = 5 resíduos de manose e 2 de galactoses.



Legenda da figura 16: vide pagina posterior

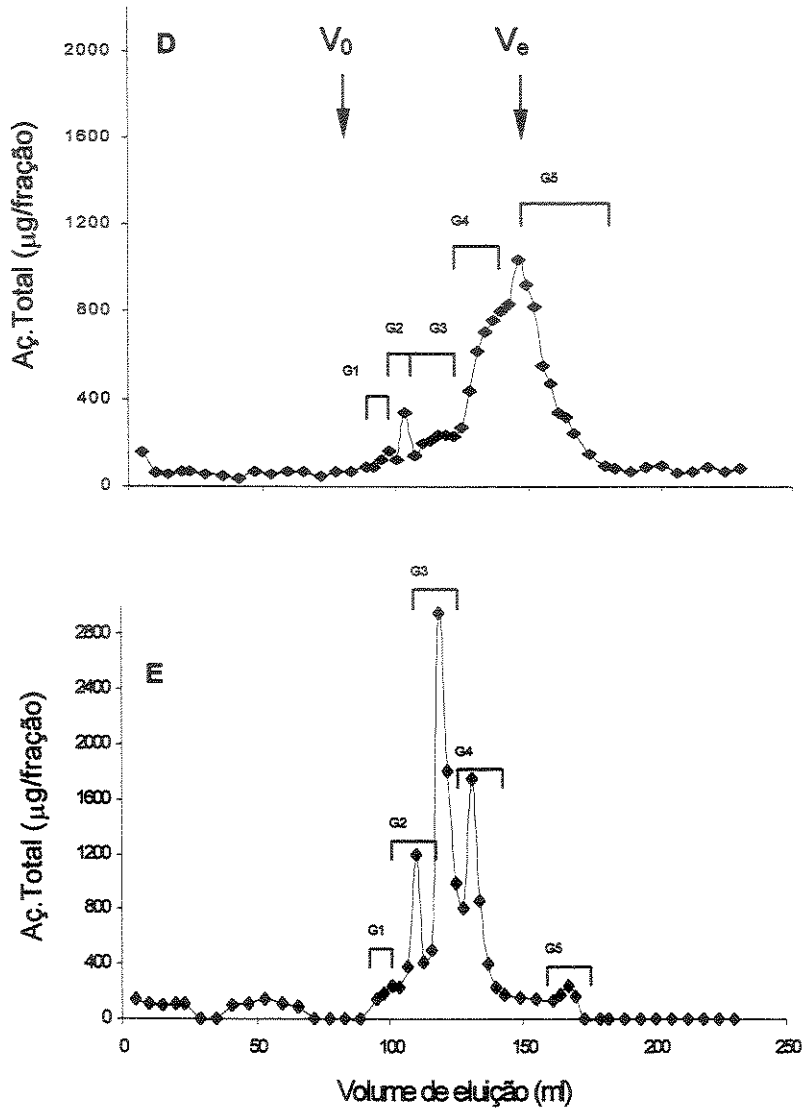


Figura 16. Perfis cromatográficos das amostras provenientes de endospermas isolados de sementes de *S. marginata*, com 1 a 5 dias de germinação, obtidos em coluna de Bio-Gel P2. (A) extrato do 1° dia, (B) do 2° dia, (C) do 3° dia, (D) do 4° dia e (E) 5° dia de germinação; V_0 = volume vazio (81 ml) e V_e = volume de eluição da coluna (152 ml). As letras G em cada perfil de eluição correspondem às frações agrupadas segundo o teor de carboidratos e ensaiadas em cotilédones de soja (Fig. 17).

Através da figura 16, pode-se notar que os perfis das amostras eluídas na coluna de Bio Gel P-2 foram bastante variaveis. Os perfis dos extratos referentes ao 2° 3° e 5° dias foram semelhantes, tendo constituintes de pesos moleculares variados. Pode-se notar que os compostos presentes no extrato do 1° dia de germinação foram

eluídos depois do volume de eluição da coluna (fig. 16A). Esses açúcares provavelmente interagiram inespecificamente com o gel da coluna, tornando o processo de separação mais lento que dos demais extratos. As frações correspondentes a cada pico, nas diferentes amostras, foram reunidas, tiveram sua massa molecular aparente calculada (tabela 1) e foram ensaiadas em cotilédones de soja (fig. 17).

Tabela 1. Reunião das frações obtidas de colunas de Bio-Gel P2, referentes a cromatogramas mostrados na fig. 16 e correspondentes aos pesos moleculares médios aparentes. A letra "G" representa grupo de frações reunidas e o índice refere-se à ordem seqüencial de eluição do conjunto. Entre parênteses são dados os intervalos de volumes de eluição correspondentes a cada grupo. Os grupos em negrito revelaram atividade indutora de fitoalexinas (fig. 17).

Extratos de endosperma	*Frações reunidas*	*Peso Molecular Médio Aparente (Da)/Grau de Polimerização Estimado*
1° dia (Fig. 16A)	G1 (90 -102)	1381
	G2 (144 - 156)	197
	G3 (159 - 168)	147
	G4 (171 - 183)	**99**
	G5 (198 - 204)	**41**
2° dia (Fig. 16 B)	G1 (84 - 90)	1678
	G2 (99 - 105)	**1031**
	G3 (114 - 126)	**574**
	G4 (129 - 138)	**389**
	G5 (159 - 171)	133
3° dia (Fig. 16 C)	**G1 (79 - 88)**	**1791**
	G2 (91 - 106)	**798**
	G3 (109 - 114)	**698/4**
	G4 (117 - 126)	574
	G5 (129 - 138)	**389**
	G6 (141 - 153)	263
4° dia (Fig. 16 D)	**G1 (92 - 101)**	**1174/7**
	G2 (104 - 107)	**966**
	G3 (110 - 122)	574
	G4 (125 - 143)	**272**
	G5 (146 - 182)	**247/2**
5° dia (Fig. 16 E)	**G1 (95-101)**	**1174**
	G2 (104 - 113)	**795/5**
	G3 (116 -125)	**574/4**
	G4 (128 -143)	**402/2**
	G5 (149 - 173)	**125**

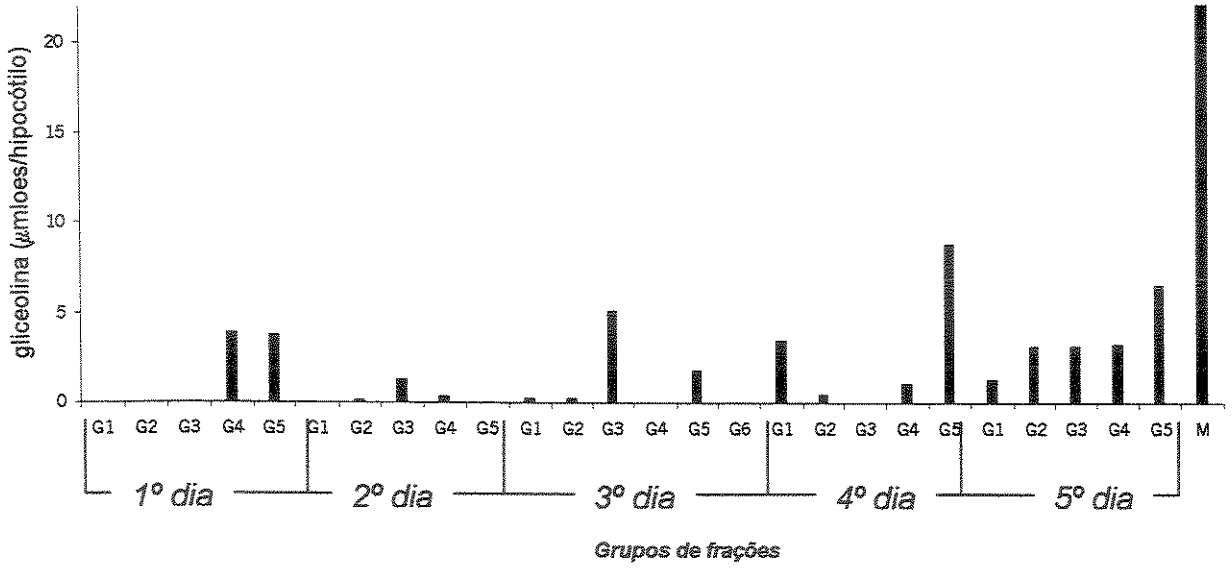


Figura 17. Atividade indutora de fitoalexinas em hipocótilos de soja, de grupos de frações reunidas obtidas de coluna de Biogel P2 (ver tabela 1). Os valores relativos à água (controle) já foram descontados. M corresponde ao eliciador (controle positivo), extraído de esporos de fungo *M. ramosissimus*.

Os grupos 4 e 5 do extrato de endosperma do 1° dia de germinação (G4 e G5), o grupo 3 do extrato de endosperma do 3° dia de germinação (G3), os grupos 1 e 5 dos extratos provenientes de endospermas do 4° dia de germinação (G1 e G5) e os grupos 2, 3, 4 e 5 dos extratos provenientes de endospermas do 5° dia de germinação (G2, G3, G4 e G5) foram os que mais induziram a produção de fitoalexinas nos cotilédones de soja. O cálculo do grau de polimerização (GP) aparente sugere que oligossacarídeos contendo de 2 a 7 resíduos de açúcares podem ser os responsáveis pela atividade indutora de fitoalexinas observada. Pela Fig. 15, nota-se que esses oligossacarídeos estão presentes nos extratos de endosperma dos 3°, 4° e 5° dias de germinação. Esses resultados sugerem que oligossacarídeos da degradação do galactomanano possam ser os responsáveis pela atividade indutora observada. Nos extratos do 1° dia, que mostraram atividade mais intensa, a massa molecular média aparente das frações ensaiadas é muito menor em comparação às moléculas do 5° dia. Isto sugere que o cálculo da massa molecular deve ter sido afetado por uma provável interação não específica com o gel da coluna, conforme já mencionado.

Dois desses extratos que se mostraram mais ativos quanto à produção de fitoalexinas foram hidrolisados com TFA e seus produtos analisados em HPEAC/PAD, em programa para detecção de monossacarídeos (Fig. 18). Foram escolhidas as frações G5 do 4° dia e G3 do 5° dia de germinação, pois eram os dois grupos que continham maior quantidade de material disponível para a hidrólise com TFA.

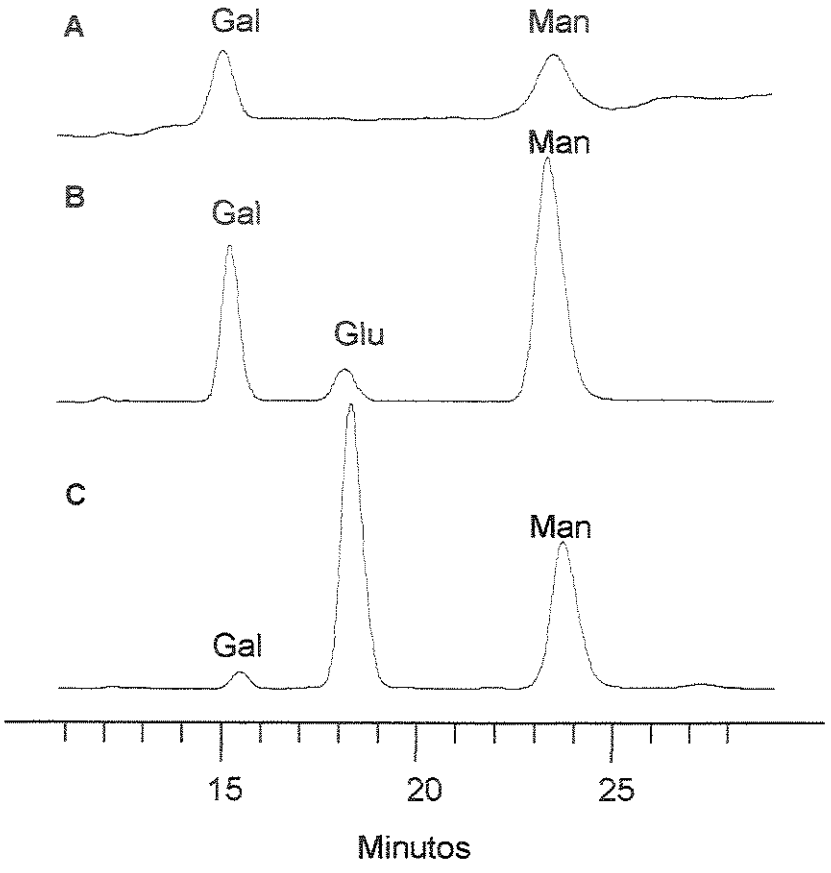


Figura 18. Perfis de eluição de hidrolisados de frações ativas provenientes da coluna de Bio Gel p-2 analisados em HPAEC/PAD em programas para detecção de monossacarídeos. Gal= galactose/ Glu=glucose/ Man= manose/ ni = não identificado, (A) padrões de monossacarídeos; (B) G5 do 4°dia e (C) G3 do 5° dia de germinação.

Através da figura 18, pode-se notar que tanto a reunião de frações G3 do 5° dia como a reunião de frações G4 do 5° dia, quando comparadas com o padrão, apresentaram os monossacarídeos manose, glucose e galactose em diferentes proporções. Certamente a galactose e a manose tratam-se de constituintes de oligossacarídeos do galactomanano presentes nos extratos do 3° e do 5° dia de

germinação. Através das áreas dos picos de cada um dos monossacarídeos foi calculada a proporção relativa existente entre a quantidade de manose e galactose nos dois grupos de frações, sendo igual a 2,3 (G5 do 4º dia) e 5,3 (G3 de 5º dia). Isto é, no grupo G5 do 4º dia de germinação, a cada 2 duas moléculas de manose, existe aproximadamente 1 de galactose, que é exatamente a razão manose:galactose no galactomanano de sementes de *S. marginata* (Buckeridge & Dietrich, 1990). Além disso, através da tabela 1, pode-se notar que esse grupo de frações possui moléculas com grau de polimerização de aproximadamente 2-3, podendo-se então deduzir que, provavelmente, a molécula presente possui 2 manoses e 1 galactose. Outra evidência está presente na figura 15A, que mostra no extrato do 4º dia de germinação a presença de um oligossacarídeo em grande quantidade que parece ser M_2G. A presença de glucose nas duas reuniões de frações analisadas pode ser explicada pela existência de sacarose nos extratos do 4º e 5º dias de germinação (fig. 12). Quando as frações foram submetidas à hidrólise com TFA, a sacarose presente nos extratos foi quebrada, gerando frutose e glucose livres, sendo então detectada a glucose (figura 18). Já a ausência de frutose nos perfis cromatográficos pode ser explicada pela possível sobreposição do pico de manose, que em alguns casos, é detectada com o mesmo tempo de retenção que a frutose. Possivelmente esta sobreposição de picos explique também a discordância na proporção nos teores de manose e galactose que ocorrem no grupo G3 do 5º dia, diferindo do padrão encontrado no galactomanano de *S. marginata*. Assim, embora ambas as frações apresentem contaminação por sacarose, os resultados dessas hidrólises indicam que a atividade indutora de fitoalexinas presente nos endospermas de *S. marginata* parece estar relacionada à presença do trissacarídeo M_2G. É interessante notar que esse fragmento aparece em maior proporção na fração G5 do 4º dia, no qual a atividade indutora é maior, quando comparada à fração G3 do 5º dia.

DISCUSSÃO

Os galactomananos são hemiceluloses de parede secundária de sementes com múltiplas funções, sendo que no início da germinação auxiliam no processo de embebição de água, protegendo o embrião contra períodos de estresse hídrico, por funcionar como um "tampão" de água (Reid & Bewley, 1979; Scherbukhin & Anulov, 1999). Isso é decorrente da existência de ramificações de galactose altamente hidrofílicas em sua estrutura, que levam à absorção de grande quantidade de água pela sementes, nos tecidos endospérmicos que envolvem o embrião. Pelas figuras 3 e 10, pode-se notar o papel de controle de entrada de água que o galactomanano exerce na semente de *S. marginata,* durante os primeiros dias de germinação. A hidratação do endosperma, ou mais especificamente do galactomanano ali presente, se estabilizou a partir do 1° dia de embebição e o endosperma forneceu água para o embrião. Pode-se evidenciar esse fato através da queda de massa de água no endosperma e o ganho paralelo por parte dos cotilédones+eixo embrionário. Este processo ocorre até que o galactomanano seja totalmente degradado, completando assim, a germinação da semente. Além da transferência de água pelo galactomanano, é provável que ocorra também absorção de água do meio diretamente pelo embrião, uma vez que a quantidade de massa de água perdida pelo endosperma é bem menor do que a massa de água ganha pelo embrião (Fig. 10C).

Por definição, a germinação engloba os eventos que têm início com a tomada de água pela semente quiescente e terminam com o alongamento do eixo embrionário (Bewley & Black, 1994). O sinal visível de que a germinação está completa é a protrusão da radícula através do endosperma e da testa da semente. Além de carboidratos de reserva, algumas leguminosas possuem, tanto no endosperma quanto nos cotilédones de suas sementes, oligossacarídeos que nutrem o embrião durante o início de seu crescimento (Reid, 1971; Buckeridge et al., 1995). Através da figura 12, nota-se a presença de galactose e sacarose logo nos primeiros dois dias de germinação das sementes. Estes resultados já eram esperados, pois de acordo com Buckeridge & Dietrich (1996), sementes de *S. marginata* possuem oligossacarídeos da série rafinósica. Estes oligossacarídeos são formados por sacarose e galactose e são

degradados antes da protrusão da radícula, servindo de fonte de carbono no início do processo de germinação da semente.

À medida que o processo de germinação ocorre, a presença dos oligossacarídeos da série rafinósica vai diminuindo, principalmente após o 2º/3º dia de germinação, quando a degradação do galactomanano tem início (Buckeridge & Dietrich, 1996). A mobilização do galactomanano em sementes de leguminosas ocorre pela ação de três hidrolases: uma α-galactosidase, uma endo β-1,4 mananase e uma β-manosidase ou exo-β-manosidase (Buckeridge & Reid, 1996).

Nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se notar que, durante o processo de germinação, o galactomanano é degradado ocorrendo a produção de monossacarídeos e oligossacarídeos (figs. 4 e 11). As cromatografias em camada delgada dos extratos de endosperma isolados revelaram a presença de oligossacarídeos de galactomanano (fig. 15A), além de manose e galactose nos extratos provenientes dos dias que finalizavam o processo de degradação do polissacarídeo de reserva. Os resultados revelaram também a presença de oligossacarídeos de tamanhos distintos, sendo constituídos no mínimo por 2 resíduos de manose até o máximo de 5 resíduos de manose e 2 de galactose. A partir do 2º dia de germinação, foi possível observar o aumento gradual da presença de galactose e manose livres e a paralela diminuição de sacarose, constatando-se, assim, o sincronismo das enzimas hidrolíticas na degradação do polissacarídeo de reserva (fig. 12).

Em estudos com *S. marginata*, Buckeridge & Dietrich (1996) mostraram que os produtos provenientes da degradação do galalactomanano (manose e galactose) foram rapidamente translocados do endosperma para o embrião em crescimento, mostrando uma similaridade quanto ao sistema de mobilização descrito por McCleary (1983) em sementes de guar. Através das figuras 3B e 10B, pode-se notar que à medida que a massa seca dos endospermas diminui, a massa seca dos cotilédones+ eixo embrionário aumenta. Estes resultados ilustram como os monossacarídeos e oligossacarídeos produzidos durante o processo de degradação do galactomanano são consumidos pelo embrião em desenvolvimento, caracterizando a relação fonte e dreno, existente entre os cotilédones+eixo embrionário e o endosperma da semente

germinante *S. marginata,* conforme anteriormente reportado por Buckeridge & Dietrich (1996).

Os oligossacarídeos isolados de paredes celulares primárias de diversas plantas têm sido descritos como moléculas sinalizadoras que, em baixas concentrações, exercem efeitos biológicos nos tecidos vegetais da planta e sua ação relaciona-se à regulação de processos fisiológicos, como crescimento, floração e morfogênese (Albersheim et. al., 1983, 1992; Gollin et al. 1984, Darvill et al., 1992) e à indução de respostas de defesas em plantas.

A indução de síntese de fitoalexinas em plantas implica na troca de sinais químicos, geralmente originários das paredes celulares das plantas e/ou do microorganismo, as quais contêm carboidratos que podem ser liberados durante o processo de interação, sob a forma de oligossacarinas. O processo de liberação e síntese de oligossacarinas tem sido estudado por vários autores (Hargreaves & Bailey, 1978; Hahn et al., 1981; 1989; Cervone et al., 1989). Durante o processo de colonização, fungos e bactérias secretam enzimas para macerar o tecido hospedeiro e desse modo, se fixarem. Estas enzimas são, em sua maioria, endopoligalacturonases (EPGs) que rompem as ligações internas de polissacarídeos pécticos da parede celular das células do hospedeiro, gerando oligogalacturonídeos que poderão ser utilizados como fonte de carbono para o microorganismo e são eliciadores endógenos da indução de fitoalexinas em algumas espécies vegetais.

Outra possibilidade de liberação de eliciadores durante as interações planta-patógeno seria a produção de oligossacarinas provenientes de paredes celulares de fungos. Esse processo ocorre como resultado da digestão autolítica das extremidades das hifas durante os processos normais de germinação de esporos e crescimento do micélio e/ou devido à ação de hidrolases das células da planta hospedeira.

Além dessas duas possibilidades de liberação de oligossacarinas, alguns trabalhos sugerem outra forma de produção dessas moléculas. York et al. (1984), estudando efeitos de fragmentos de xiloglucano produzidos *in vivo*, foram os primeiros a demonstrar que nonassacarídeos (XXFG) de xiloglucano, principal polissacarídeo hemicelulósico de dicotiledôneas, em concentrações de $10^{-8} - 10^{-9}$ M, podiam inibir o crescimento de hipocótilos de ervilha induzido pela aplicação de de 2,4 – D 10^{-6} M,

sendo estes dados confirmados por McDougall & Fry (1988), Emmerling & Seitz (1990) e Hoson & Masuda (1991, citados por Aldinton & Fry, 1993).

Esta estratégia de produção de oligossacarinas pode ser vista também em caule de *Populus monilifera,* no qual oligossacarídeos derivados de galactoglucomanano, com grau de polimerização entre 4 e 8, apresentam atividade biológica, sendo capazes de inibir o crescimento de segmentos de caule de ervilhas induzido por 2,4-D. A concentração da solução utilizada para que a atividade biológica fosse detectada foi de 10^{-10} M. Em concentrações maiores, os oligossacarídeos de galactoglucomanano não produziram efeito tóxico nos caules de ervilha (Auxtová et al., 1995).

Pode-se dizer então que, através de processos fisiológicos próprios, como a degradação de polissacarídeos de parede celular, algumas espécies vegetais produzem oligossacarinas *in vivo*. Estas são indicações de que pode haver síntese e liberação de oligossacarinas em tecidos vivos de plantas, sem que haja a indução por parte de algum tipo de agente externo, seja este biótico ou abiótico.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que oligossacarídeos provenientes da degradação do galactomanano, além de serem utilizados pelo embrião como fonte de carbono durante a germinação das sementes de *S. marginata*, são moléculas que desempenham o papel de oligossacarinas eliciadoras da produção de compostos de defesa.

As figuras 5 e 13 evidenciaram que extratos de diferentes estádios de germinação de sementes de *S. marginata*, quando aplicados em cotilédones de soja (*Glycine max),* eliciam a síntese de fitoalexinas (gliceolinas). Isso indica que moléculas indutoras de natureza química distinta podem estar contribuindo para essa atividade uma vez que a degradação do galactomanano só ocorre a partir do 3º dia de germinação. A presença contínua dessas moléculas durante a fase de mobilização de reservas, seja dos açúcares solúveis hidrolisados no início da germinação, seja do galactomanano, parece indicar a existência de uma estratégia de defesa diretamente associada ao metabolismo de carboidratos da semente de *S. marginata.*

A relação entre o tamanho do oligossacarídeo (GP) e a atividade biológica tem sido observada em eliciadores endógenos. A síntese de fitoalexinas e de lignina

nas respostas de defesa restritas às regiões que rodeiam a injúria ou infecção é ativada por oligogalacturônideos de GP entre 10 e 14 (Nothnagel et al., 1983). Como já mencionado, Auxtová et al. (1995) observaram que oligossacarídeos derivados de galactoglucomanano de *Populus monilifera,* com grau de polimerização entre 4 e 8, apresentaram atividade biológica sobre o crescimento de segmentos de caule de ervilha. Portanto, fragmentos de parede celular com os mais variados GP's podem apresentar atividade biológica. Pela análise de HPLC (fig. 18), o oligossacarídeo encontrado na fração da coluna de Bio Gel P-2 referente ao extrato do 4º dia de germinação de *S. marginata* parece possuir GP igual a 3 (fig. 18), inferior aos oligogalacturonídeos que induzem respostas rápidas de defesas, como a morte localizada de células próximas ao sítio de infecção (Cervone et al., 1989). Nos trabalhos consultados, em que oligossacarinas produzidas *in vivo* possuem efeitos biológicos, estas possuem grau de polimerização entre 4 e 8 (Auxtová et al., 1995) ou 9, como no caso de oligossacarídeos de xiloglucano (York et al., 1984).

A sugestão de que o trissacarídeo M_2G seja a molécula responsável pela atividade indutora observada a partir do 3º dia de germinação é plausível, uma vez que essa atividade foi maior nas frações da coluna de Bio Gel-P2 provenientes dos 4º e 5º dias de germinação, quando grande parte do galactomanano já havia sido degradado e maior teor desses oligossacarídeos de pequeno GP foi detectado (fig. 15).

Apesar de neste trabalho não ter sido realizado nenhum ensaio utilizando cotilédones da própria semente, em ensaios preliminares, Braga & Buckeridge (comunicação pessoal) aplicaram em cotilédones da própria planta, extratos brutos provenientes de endospermas de sementes de *S. marginata* com 3 dias de germinação e constataram a síntese de fitoalexinas. Isso indica que essas moléculas também possuem atividade indutora não somente em soja, mas na própria semente.

Considerando-se os resultados obtidos, este trabalho sugere que oligossacarídeos de galactomanano são capazes de induzir a síntese de fitoalexinas e outros compostos de defesa na própria semente de *S. marginata.* A liberação de oligossacarinas nas sementes estudadas pode ser comparada à produção de oligossacarinas produzidas a partir da interação planta/patógeno. Nesse caso, há a liberação de oligogalacturonídeos de paredes celulares de plantas, através da ação de

UNICAMP

endopoligalacturonases (EPG) de fungos, sendo que estes oligossacarídeos de pectina são utilizados como nutrientes para o microorganismo e como moléculas eliciadoras de fitoalexinas, para o hospedeiro. Em sementes de *S. marginata* parece ocorrer processo semelhante, porém sem a participação de um organismo externo. À medida que o galactomanano é degradado, para que em seguida seja utilizado na nutrição do embrião em crescimento, os produtos da degradação também podem induzir a síntese de substâncias de defesa durante a germinação da semente.

Ao relacionar o galactomanano com mecanismos de defesa em sementes, o presente trabalho sugere um novo e importante papel do carboidrato de reserva, para o estabelecimento e desenvolvimento das sementes de *S. marginata*. A hipótese de que oligossacarídeos provenientes da degradação do galactomanano sejam eliciadores endógenos de fitoalexinas abre perspectivas para o estudo de mecanismos de defesa regulados por oligossacarinas provenientes de carboidratos de reserva, algo novo no estudo do metabolismo em sementes.

CAPITULO II - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE INIBIDORA DO CRESCIMENTO DE FUNGOS

INTRODUÇÃO

Substâncias orgânicas originadas de plantas podem ser divididas em dois grupos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são moléculas constituintes e essenciais, oriundas das principais rotas do metabolismo celular. Os metabólitos secundários são moléculas de pequena massa molecular, oriundas de rotas biossintéticas especiais, de ocorrência restrita e/ou característica de determinados vegetais. Por serem constituintes específicos de certas espécies e, sendo assim, ausentes em outras, os compostos secundários parecem moléculas não tão essenciais à vida das plantas como os compostos primários. Porém, de acordo com Vickery & Vickery (1981), também são substâncias necessárias à vida da planta, pois estão relacionadas a uma variedade muito grande de mecanismos reguladores do crescimento, relação planta-ambiente, floração e defesa.

As três principais rotas metabólicas de formação de compostos secundários são as vias do acetato-malonato, acetato-mevalonato e do chiquimato. Estas vias, por sua vez, originam compostos secundários que podem ser divididos em 3 grandes grupos: substâncias terpênicas, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) (Harborne, 1988).

Alcalóides, terpenos, lignóides e flavonóides são alguns exemplos de substâncias secundárias e muitas delas possuem importância econômica devido à utilização na indústria de cosméticos, alimentos e medicamentos (Lin et al., 1999; Pino & Borges, 1999; Parmar et al., 1997).

Alelopatia: uma relação entre planta e ambiente

Os vegetais são organismos bastante suscetíveis ao ataque de predadores, uma vez que representam uma fonte de nutrientes de fácil aquisição por parte dos animais que os utilizam como alimento. Segundo Lovett (1986), apesar de possuírem a vantagem do autotrofismo, as plantas são imóveis não podendo escapar ao ataque de seus inimigos. É, portanto, compreensível que com a escassez de outras alternativas,

utilizem com maior intensidade que os animais a estratégia de acumular compostos químicos para sua defesa.

Alguns metabólitos secundários estão envolvidos em interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores, patógenos, atração de polinizadores, inibição de espécies competitivas e são classificados como substâncias alelopáticas ou aleloquímicos. Estes compostos são produzidos em qualquer órgão ou tecido vegetal e são liberados no ambiente, causando efeitos diretos ou indiretos sobre outro organismo, podendo este efeito ser benéfico ou maléfico ao organismo alvo. Portanto, o termo alelopatia pode ser definido como qualquer efeito causado direta ou indiretamente por um organismo sobre o outro, através da liberação de substâncias por ele elaboradas (Almeida, 1988).

Os primeiros registros sobre a habilidade das plantas influenciarem o desenvolvimento de outras foram feitos por Democritus (500 A.C.) e Theopharastus (300 A.C.), os quais expuseram que a leguminosa *Cicer arietinum* exauria o solo (Smith & Secoy, 1977 citado por Gomide, 1993). A partir de então, vários foram os relatos sobre fenômenos alelopáticos (Rodrigues et al., 1992; Li et al., 1992; Durigan & Almeida, 1993).

Segundo Almeida (1991), os aleloquímicos reduzem a competição com outras plantas por atuarem no seu desenvolvimento, defendem as plantas de herbívoros pelo seu paladar desagradável e/ou por serem venenosas, protegem-nas de patógenos inibindo o seu desenvolvimento, têm ação repelente ou atraente sobre os insetos. Atuam ainda sobre esporos de fungos, interferindo no seu desenvolvimento, em insetos e nematóides (Putnam e Duke, 1978). Sendo assim, sua ação não se restringe tão somente a outras espécies vegetais, mas também, a microorganismos, apesar da grande maioria dos trabalhos referir-se ao estudo da relação alelopática planta-planta.

Quanto à natureza química, substâncias alelopáticas incluem ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (Putman & Duke, 1978). Estas substâncias atuam nas atividades vitais das plantas, ou seja, em processos relacionados ao crescimento (divisão celular, sínteses orgânicas, interações com hormônios, efeitos na síntese ou ativação

enzimática); ao metabolismo respiratório; à fotossíntese (movimento estomatal, conteúdo de clorofila, área foliar, fotofosforilação, atividade da ATPase da membrana do cloroplasto) e à absorção de nutrientes (absorção de íons, efeitos nas membranas, efeitos nas relações hídricas) (Einhellig, 1986; Almeida, 1988; Durigan & Almeida, 1993).

Nas relações alelopáticas, não existe a necessidade de prévio contato entre a planta e o organismo alvo, para a liberação dos aleloquímicos. Estes compostos são constitutivos dos vegetais em geral e são normalmente liberados através da decomposição de folhas e caules, por processos físicos e biológicos, através de exsudação direta no solo pelas raízes ou através da deterioração de raízes mortas, por volatilização e podem ainda ser lixiviados da superfície das plantas pela chuva ou orvalho (Lucchesi & Oliveira, 1988; Almeida, 1991; Durigan e Almeida, 1993).

Fisher et al. (1989) sugeriram que lactonas sesquiterpênicas encontradas em seus estudos podem agir como reguladores de crescimento, estimulando ou inibindo o crescimento de radículas e inibindo a germinação de sementes.

Rasmussen et al. (1992) demostraram que o sorgoleone, substância exsudada de raiz de sorgo (*Sorghum bicolor)*, é um potente inibidor da respiração em mitocôndrias isoladas de soja (*Glycine max)* e milho (*Zea mays)*. Dados espectrofotométricos sugeriram que um possível mecanismo de inibição do sorgoleone é o bloqueio do fluxo de elétrons entre o complexo citocromo b e c_1 na cadeia transportadora de elétrons.

Compostos com atividade antifúngica em plantas

Substâncias fungitóxicas constitutivas do próprio vegetal têm sido estudadas por diversos autores. Triterpenóides antifúngicos constitutivos de plantas superiores foram descritos e identificados em *Mollugo pentaphylla, Ecballium elaterium* e *Chisocheton paniculatus* (Grayer & Harborne, 1994).

Em folhas de *Morithamnus crassus*, família Asteraceae, a partição com hexano/AcOEt levou ao isolamento e identificação de diterpenos com atividade fungitóxica para o fungo *Cladosporium sphaerospermum* (Silva et al., 2000).

No óleo de sementes de *Azadirachta indica*, por extração com MeOH 90%, foram identificados terpenóides fungitóxicos, que mostraram atividade contra fungos patogênicos. A atividade fungitóxica somente foi detectada com a mistura de terpenóides, sendo nula quando eles foram ensaiados isoladamente (Govindachari et al., 1998). Nidiry (1999) descreveu a ação antifúngica de compostos terpenoídicos em extratos de sementes de tomate.

Em sementes de *Sesbania drummondii,* Powell et al. (1983) isolaram sesbanimidas, sendo um destes compostos ativo contra tumores. Outras espécies de *Sesbania* foram relatadas como tóxicas, no que se refere à presença de alcalóides e glicosídeos cianogênicos (Weedon, 1923).

Braga & Buckeridge (1997), estudando *Sesbania marginata*, detectaram grande quantidade de açúcares na água de germinação de suas sementes, sem que, no entanto, houvesse o crescimento de fungos. A explicação para este fato foi a presença de substâncias fungitóxicas, tanto nos exsudados das sementes (Braga & Buckeridge, 1997; Rahal et al., 2000), quanto nos seus cotilédones (Astarita et al., 1999). Os exsudados dessas sementes também mostraram atividade alelopática em sementes de alface, inibindo o crescimento de suas radículas (Braga & Buckeridge, 1997).

Ao contrário das relações alelopáticas, existem mecanismos de defesa que dependem do contato entre planta e organismo alvo para que sejam ativados. A síntese de compostos de defesa do tipo fitoalexinas somente ocorre após a troca de sinais químicos entre a espécie vegetal e o patógeno. As fitoalexinas, naturais do metabolismo secundário de plantas, pertencem a vários grupos químicos, tais como, terpenos, flavonóides, diidrofenantrenos, estilbenos, cumarinas, alcalóides, furanoacetilenos, antraquinonas, poliacetilenos e polienos (Harborne, 1999), possuindo predominantemente atividade antifúngica.

Atualmente, mais de 300 fitoalexinas já foram descritas, em aproximadamente 900 espécies, pertencentes à cerca de 40 famílias de angiospermas (Harborne, 1999). Dessas 300 fitoalexinas, 130 foram descritas como provenientes de espécies de Leguminosae (Fabaceae), ocorrendo em diversos órgãos vegetais.

Espécies de Leguminosae produzem fitoalexinas de natureza flavonoídica, as quais exibem elevada atividade antifúngica (Ingham, 1982). Dentre elas, destacam-se as plantas de soja, que são muito sensíveis a diferentes eliciadores obtidos de microorganismos, sendo as mais utilizadas como planta-teste para o bioensaio *in vitro* para detecção da atividade indutora de fitoalexinas de fungos e bactérias e em moléculas eliciadoras deles derivadas (Ayers et al. 1976b).

OBJETIVOS

Sesbania marginata Benth. é uma leguminosa tropical (subfamília Faboideae) cujas sementes exsudam grande quantidade de açúcares na água de germinação, sem que ocorra a contaminação por microorganismos. Considerando que mecanismos de defesa em plantas contra patógenos são comuns em sementes, embora venham sendo muito pouco estudados em espécies tropicais, o objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar as substâncias fungitóxicas exsudadas de sementes de *S. marginata* durante germinação.

MATERIAL BIOLÓGICO

- ❖ sementes de *Sesbania marginata* Benth coletadas na entrada da Secretaria da Agricultura, localizada próxima ao Instituto de Botânica de São Paulo;
- ❖ esporos de fungo *Cladosporium sphaerospermum* Pemzig (SPC 491), com 8 dias de cultivo em meio BDA (batata-dextrose-ágar), no escuro a 25°C;

MÉTODOS

1. Extração de substâncias fungitóxicas dos exsudados de sementes

Em ensaios preliminares, exsudados foram obtidos através de germinação de 700 sementes de *S. marginata* escarificadas manualmente, distribuídas em placas de Petri, com papel de filtro umedecido em água destilada e mantidas em sala de germinação, sob fotoperíodo de 12 horas, a 25°C. Durante 7 dias, a cada 24 h, as placas foram retiradas e os exsudados foram obtidos lavando-se o papel de filtro com água destilada. A água de germinação resultante foi extraída duas vezes com igual volume de acetato de etila e a fração orgânica concentrada em evaporador rotatório até a secura. Uma alíquota dos extratos referentes a todos os dias de germinação, retomada em acetato de etila, foi analisada por cromatografia de camada delgada e revelada segundo o método descrito por Homans & Fuchs (1970) (item 1.4). O resultado obtido na cromatografia mostrou que substâncias fungitóxicas estavam presentes em todos os extratos, porém em maior quantidade naqueles correspondentes a 48 h de germinação das sementes. A partir de então, este foi o estádio escolhido para a realização da extração dos exsudados da água de germinação das sementes.

1.1. Germinação de sementes

Os exsudados de sementes de *S. marginata* foram obtidos através de germinação de aproximadamente 8000 sementes escarificadas mecanicamente em moinho de bolas. Este procedimento foi realizado com o auxílio de uma pequena quantidade de areia colocada junto com as sementes no interior da câmara de trituração do aparelho, porém sem a presença da esfera de aço. Através do atrito das sementes com a areia e as paredes da câmara, estas foram escarificadas durante 5

min. As sementes escarificadas foram lavadas com água destilada, secas e distribuídas em 16 bandejas (500 sementes/placa), com papel de filtro umedecido com 70 ml de água destilada e mantidas em câmara de germinação, sob fotoperíodo de 12 horas e sob irradiação de 437$\mu w.cm^{-2}.s^{-1}$, a 25° C. Após 48 h, os exsudados foram obtidos recolhendo-se a água de germinação e lavando-se o papel de filtro com o auxílio de 500 ml de água destilada/bandeja, totalizando 8 litros de extrato aquoso, que foram fracionados, de acordo com metodologia mostrada em detalhes no fluxograma da figura 19.

1.2 Extração e fracionamento das substâncias fungitóxicas por cromatografia em coluna XAD-2

Cerca de 7,8 litros de extrato aquoso obtido no item 1.1. foram aplicados em uma coluna de 10 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro preenchida com resina XAD-2, e eluídos com diferentes solventes seguindo um gradiente de polaridade decrescente. Primeiramente, foram utilizados 300 ml de metanol:água (1:1), seguidos de 300 ml de metanol e finalmente de acetato de etila. Frações de 300 ml (um pouco mais que o volume da coluna) foram coletadas e secas em evaporador rotatório e solubilizadas com 500 µl de metanol, sendo que a quantidade aplicada correspondente a 3,0% da massa seca total de cada amostra. O metanol foi escolhido como solvente para retomada do material para que a maioria das substâncias pudesse ser solubilizada. O sistema de solventes utilizado foi clorofórmio:metanol (9:1) (v/v) e a revelação da cromatoplaca foi feita com iodo.

Além dos eluentes utilizados na coluna de XAD-2, foram realizadas também duas partições com acetato de etila: uma com 300 ml do extrato aquoso bruto sem que este tivesse sido desenvolvido em XAD-2 e a outra partição com 300 ml do extrato aquoso após aplicação na coluna de XAD-2 (resíduo). Esses extratos foram secos, submetidos à cromatografia de camada delgada e revelados com iodo. O objetivo deste procedimento foi detectar presença das substâncias no extrato aquoso e verificar os parâmetros de retenção da XAD-2.

1.3 Fracionamento dos extratos resultantes da coluna de XAD-2

Objetivando-se purificar as substâncias fungitóxicas da fração metanólica da cromatografia por XAD-2, foi realizada cromatografia em coluna de sílica flash 40-63 μm da Merck. A coluna utilizada possuía 3 cm de altura e 1,3 cm de diâmetro. Foram aplicados cerca de 60 mg de extrato metanólico bruto e 5 frações foram coletadas (10 ml cada). Foram utilizados 10 ml dos seguintes eluentes: clorofórmio, clorofórmio:metanol (98:2 v/v), clorofórmio:metanol (95:5), clorofórmio: metanol (90:10) e metanol. Depois de coletadas, as frações foram secas e pesadas para posterior análise por cromatografia em camada delgada.

A fração metanol:água (1:1) proveniente da cromatografia por XAD-2 também foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica flash (4,0 x1,5 cm). Os eluentes utilizados foram os mesmos e na mesma ordem de seqüência da coluna anterior, exceto pela não utilização de clorofórmio:metanol (95:5), pois este sistema não apresentou boa resolução das substâncias, na coluna anterior. O volume utilizado foi 30 ml de cada solvente, pois a coluna era maior do que aquela utilizada para eluir a fração metanólica descrita acima. Foram aplicados aproximadamente 250 mg da fração de metanol:água (1:1) e coletadas 4 frações de 30 ml. Depois de coletadas, as frações foram secas e pesadas para posterior análise por cromatografia em camada delgada.

1.4 Bioautografia das frações provenientes da coluna de sílica

A confirmação da fungitoxicidade dos extratos obtidos no item 1.3 foi feita através de método de bioautografia descrito por Homans & Fuchs (1970). Em placas de gel de sílica, alíquotas dos extratos foram aplicadas e estas desenvolvidas em sistema de solventes clorofórmio:metanol (9:1 v/v). Para a revelação da placa foram utilizados esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum,* cultivado em meio BDA durante 8 dias, suspensos em meio de sais minerais e glucose. A suspensão de esporos foi nebulizada sobre as cromatoplacas e as substâncias fungitóxicas foram detectadas como zonas de inibição de crescimento do fungo, após 72 horas de incubação em estufa a 25°C, no escuro. Foram feitas análises em HPLC e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Protônica de todas as frações, pelo Prof. Dr. Alberto Cavalheiro, do Instituto de Química Orgânica da UNESP de Araraquara.

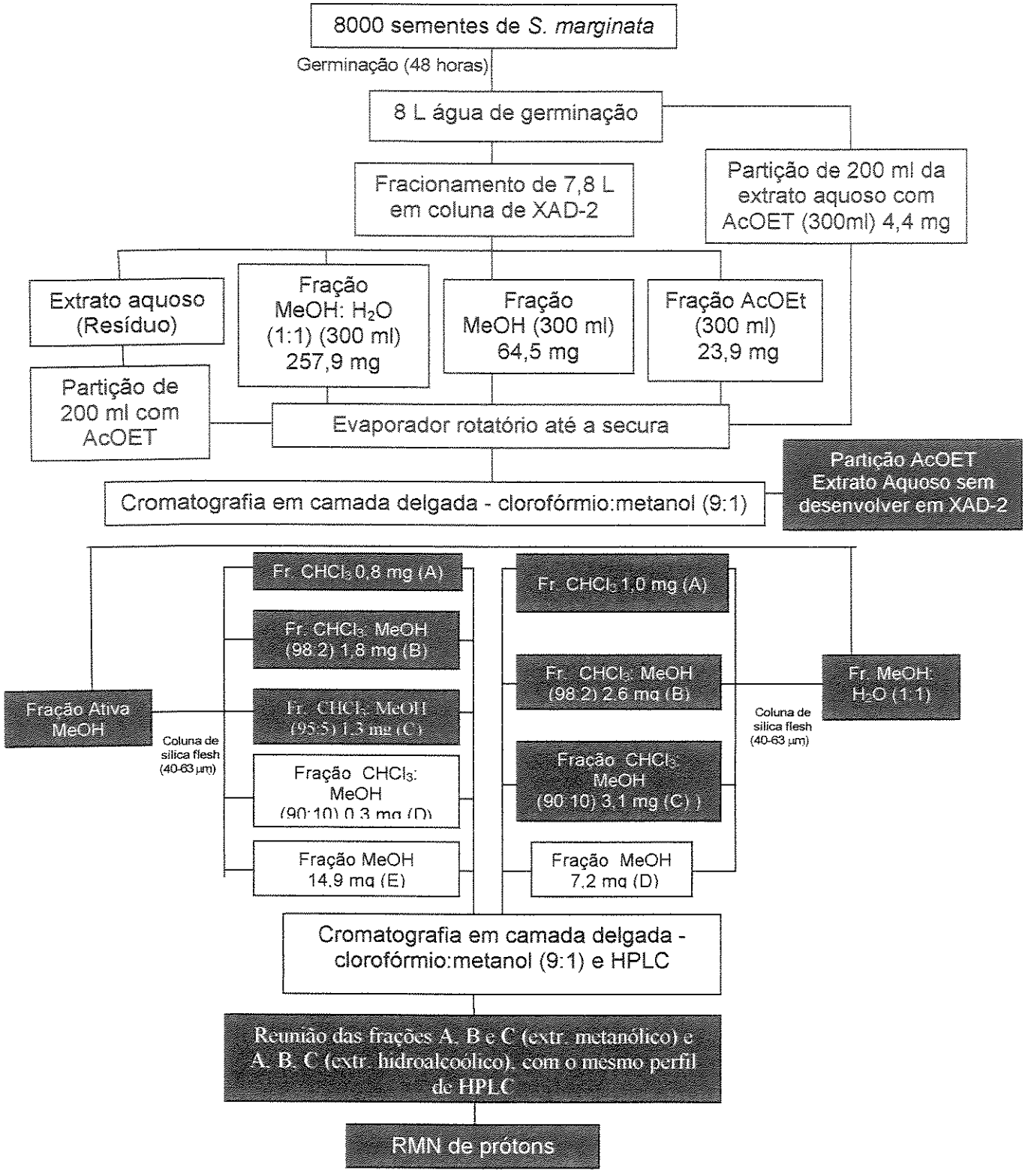


Figura 19. Fluxograma utilizado para extração e fracionamento parcial das substâncias fungitóxicas presentes na água de germinação das sementes de *S. marginata*. As frações em azul correspondem àquelas em que a atividade fungitóxica foi detectada.

2. Extração de substâncias fungitóxicas de sementes íntegras de *S. marginata*

2.1 Germinação das sementes

Neste experimento foram utilizadas cerca de 16.700 sementes escarificadas de acordo com metodologia descrita no item 1.1. As sementes foram lavadas com água destilada, secas e distribuídas em 16 bandejas (cerca de 1000 sementes/bandeja), com papel de filtro umedecido com 170 ml de água destilada e mantidas em câmara de germinação, fotoperíodo de 12 horas e irradiação de 437 μ w. cm^{-2}. s^{-1}, a 25° C. Após 48 horas de germinação, as sementes que não sofreram o processo de embebição foram descartadas. As sementes que embeberam normalmente foram retiradas das câmaras de germinação e secas em estufa a 30° C durante 72 horas. Em seguida, as sementes secas foram moídas e a massa do pó foi determinada, totalizando 1,076 kg. Este material foi submetido à extração de substâncias fungitóxicas com vários solventes (item 2.2). Os extratos obtidos destas 16.700 sementes foram fracionados de acordo com metodologia mostrada em detalhes na figura 20.

2.2 Extração de substâncias fungitóxicas do pó de sementes

As sementes moídas foram colocadas em 4 frascos e extraídas com hexano, seguido de clorofórmio, clorofórmio:metanol (9:1) e metanol (2 litros cada) em banho-maria a 30 °C durante 15 minutos, com vibração por ultra-som. Esse procedimento foi realizado 4 vezes para cada solvente utilizado. Foram assim realizadas 4 extrações com 4 tipos de solventes. As extrações correspondentes a cada solvente foram reunidas e os extratos concentrados até a secura e determinadas suas respectivas massas. Uma alíquota de cada um dos extratos foi analisada por cromatografia de camada delgada e revelada com esporos de fungos, para confirmação da presença das substâncias fungitóxicas nos extratos, conforme método descrito no item 1.4. Os extratos que mostraram ter atividade inibidora do crescimento de fungos foram os de clorofórmio:metanol (9:1) e metanol.

2.3 Fracionamento do extrato metanólico

O extrato metanólico foi submetido a cromatografia em coluna (40 x 5,0 cm) de gel de sílica Aldrich de 70 - 230 mesh. O volume total da coluna foi determinado em 785 ml, sendo então coletadas 170 frações com aproximadamente 50 ml cada, totalizando assim, cerca de 8,5 litros de frações coletadas. Os eluentes utilizados foram clorofórmio (2200 ml), clorofórmio:metanol (98:2) (2850ml), clorofórmio:metanol (95:5) (2350 ml) e clorofórmio:metanol (9:1) (1100 ml).

Depois de coletadas, as frações foram secas e pesadas tendo uma massa total de 265 mg. Em seguida foi realizada uma análise por cromatografia em camada delgada e revelação com iodo. As frações que possuíam perfis cromatográficos semelhantes, com relação à revelação com iodo, foram reunidas dando origem aos grupos A, B, C, D, E, F, G_1, G_2, G_3, H, I, J, K, L e M. Estes grupos foram analisados em cromatografia de camada delgada, porém, desta vez, a revelação foi feita com fungos (técnica descrita no item 1.4). Os grupos E, F, G_1, G_2, G_3, H, I, J, K, L foram os que apresentaram a presença de uma substância fungitóxica com o mesmo Rf. Estes grupos de frações foram desenvolvidos em cromatografia de camada delgada, para purificação das amostras (item 2.4).

2.4 Cromatografia preparativa em camada delgada das amostras reunidas

Foram utilizadas placas de sílica gel 60 (20 cm x 10 cm) de 0,25 mm de espessura contendo fluoresceína e dissolvidas em clorofórmio:metanol (9:1). Após o desenvolvimento das placas, suas laterais foram cortadas e reveladas com esporos de fungos (de acordo com item 1.4). Assim foi possível determinar seguramente o Rf das substâncias fungitóxicas e realizar a raspagem das faixas de interesse. A retirada das substâncias de interesse impregnadas na sílica foi realizada através da eluição da sílica por 24 horas com clorofórmio:metanol (1:1). O material re-eluído da sílica foi reunido tendo como rendimento 54,7 mg.

2.5 Análise das frações reunidas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Uma alíquota de 5 mg/ml do material proveniente das cromatografias preparativas de camada delgada obtidas no item 2.4, foi analisada por HPLC em sistema Varian, em coluna C18 semi-preparativa. O eluente utilizado para análise foi metanol:água (95:5) isocrático, em um fluxo de 3 ml/min, durante 20 min. A cada análise foram aplicados 600 µl de amostra e coletadas 10 frações de 6 ml cada (1 fração a cada 2 min). As frações coletadas foram aplicadas em placas cromatográficas e reveladas com fungo com o objetivo de se detectar as frações com atividade fungitóxica. Depois de definido o tempo de retenção da substância de interesse, o restante do material foi aplicado no aparelho, mantendo-se as condições de purificação parcial das substâncias. Este material foi enviado ao Dr Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da USP para análise por Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN-^{1}H) e de Carbono 13 (RMN-^{13}C). Os espectros de RMN- ^{13}C (PND) foram registrados no espectrômetro Bruker AC-200 (Instituto de Química - USP), operando a 200 e 50 MHz para ^{1}H e ^{13}C, respectivamente. O deuterocloroformio foi utilizado como solvente e como padrão de referência interna.

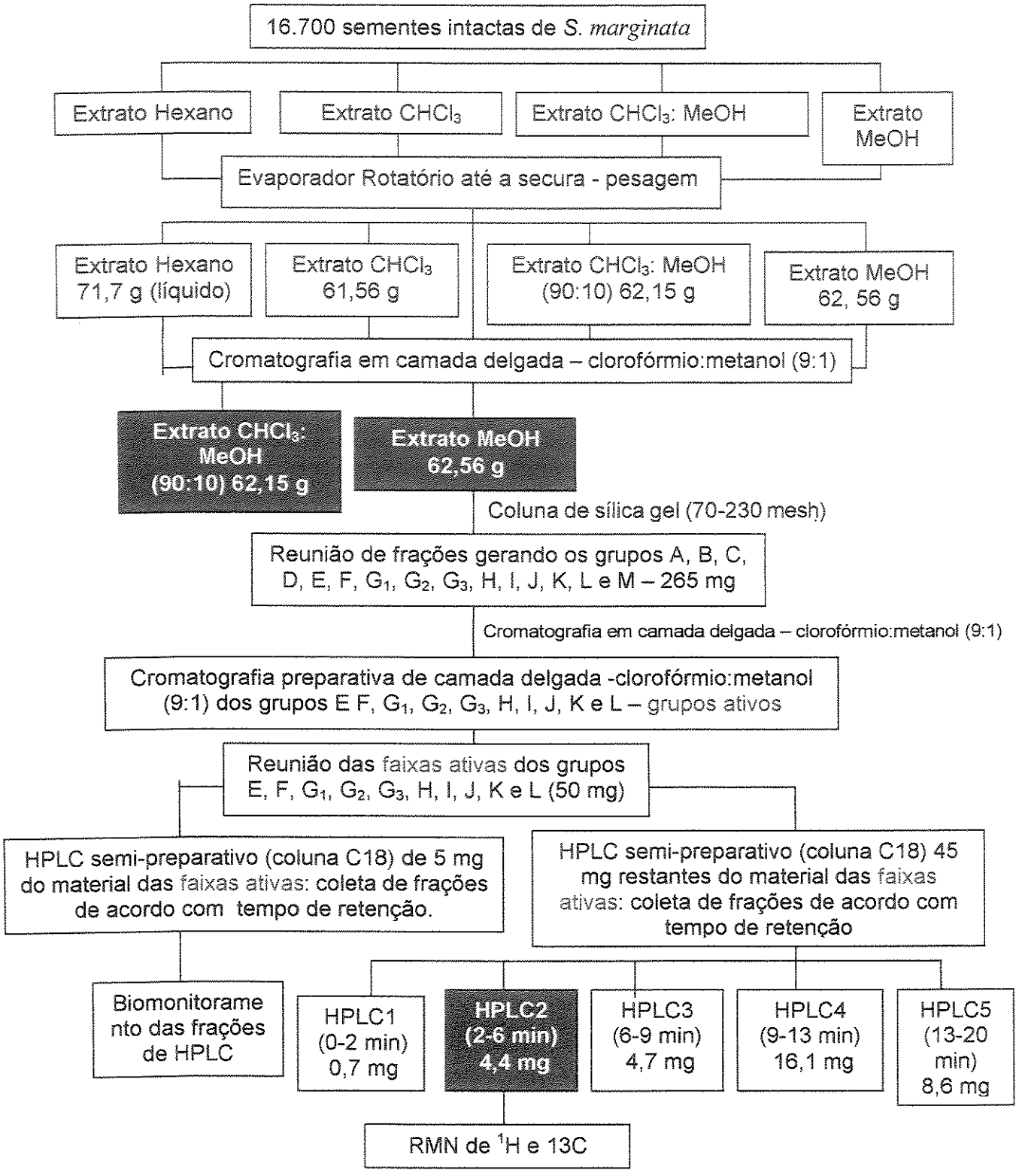


Figura 20. Fluxograma utilizado para a extração e fracionamento parcial da substância fungitóxica presente no extrato metanólico de sementes intactas de *S. marginata*. As frações em azul correspondem àquelas em que a atividade fungitóxica foi detectada.

RESULTADOS

1. Substâncias fungitóxicas dos exsudados de sementes

Estudos preliminares demonstraram que sementes de *S. marginata* possuem substâncias inibidoras de crescimento de fungos, encontradas em seus exsudados (fig. 21).

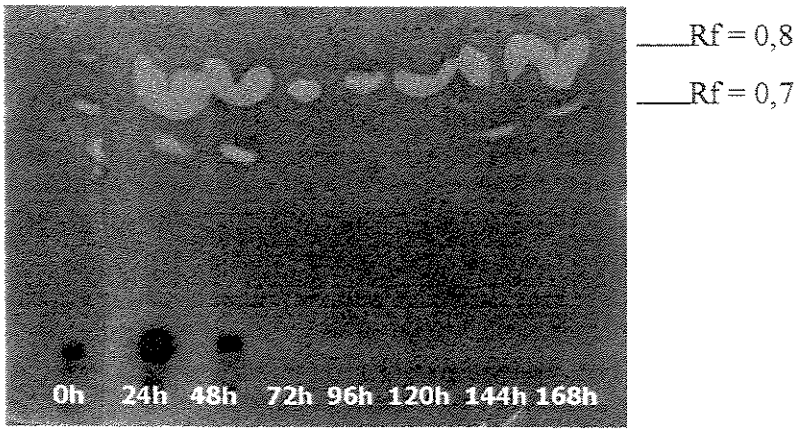


Figura 21. Bioautografia de exsudados de sementes de *S. marginata* desenvolvidos em clorofórmio:metanol (9:1 v/v) e utilizando esporos de fungos *Cladosporium sphaerospermum* como agente revelador. As zonas claras correspondem à presença de substâncias inibidoras do crescimento de fungo revelador.

Através da figura 21, pode-se notar que substâncias fungitóxicas estão presentes já nas sementes quiescentes (0 hora), e aquela de Rf=0,7 parece ter seu maior acúmulo em 48 horas de germinação. A atividade inibidora correspondente a este Rf não foi detectada entre 72 e 120 horas de germinação. A zona de inibição correspondente ao Rf=0,8, por sua vez, também está presente em pequena quantidade na semente quiescente, mas aparece de maneira intensa durante toda a germinação da semente. Embora pela bioautografia não seja possível fazer afirmações seguras com relação às quantidades de substâncias presentes nos extratos, em 48 horas de embebição, as sementes de *S. marginata* parecem liberar quantidades consideráveis de metabólitos fungitóxicas para a água de germinação, sendo este o estádio escolhido para a extração das substâncias de interesse.

Grande parte da água de germinação obtida de 8000 sementes de *S. marginata* foi fracionada por cromatografia em coluna de XAD-2. Alíquotas também foram submetidas a duas partições com acetato de etila: uma com o extrato aquoso sem que este tivesse sido desenvolvido em XAD–2 e a outra com o extrato aquoso desenvolvido em XAD-2 (resíduo). Portanto, a partição feita com extrato aquoso desenvolvido em XAD-2 + acetato de etila não deveria conter as substâncias fungitóxicas em grande concentração, já que possivelmente teriam ficado presas à resina.

As frações eluídas de XAD-2 e os extratos resultantes das partições das alíquotas foram secos, pesados e desenvolvidos em cromatografia de camada delgada para determinação do Rf. A revelação da cromatografia foi realizada com iodo e as substâncias foram identificadas através de seu Rf (fig. 22).

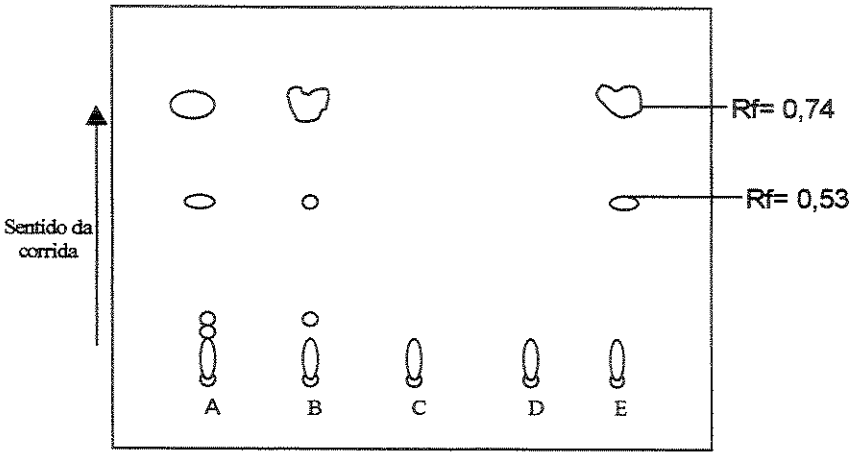


Figura 22. Cromatoplaca das frações provenientes da água de germinação de sementes de *S. marginata,* desenvolvida em clorofórmio:metanol (9:1) e revelada com iodo. (A) fração metanol:água (1:1); (B) fração metanol; (C) fração acetato de etila; (D) fração da partição de extrato aquoso com tratamento em XAD-2 e (E) fração da partição de extrato aquoso sem tratamento em XAD-2.

Considerando-se que o sistema de solventes utilizado na figura 22 foi o mesmo que aquele da figura 21, os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada (fig. 22) indicaram que as frações que possuíam substâncias de interesse eram referentes à partição de acetato de etila feita com extrato aquoso não desenvolvido em XAD-2 (E), a fração metanol:água (1:1) (A) e a fração metanólica (B), ambas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

provenientes da coluna de XAD-2. Nestas frações, com aproximadamente as mesmas características quanto à sua polaridade, nota-se a presença de um material com Rf= 0,53 e outro material menos polar com Rf= 0,74.

Dando início à etapa de purificação, as frações de interesse (A e B) foram dissolvidas em clorofórmio e eluídas em coluna de sílica flash, objetivando-se separar as substâncias ativas daquelas sem potencial fungitóxico (fig. 19). O solvente escolhido para re-eluição foi o clorofórmio, pois de acordo com a cromatografia anterior, as substâncias procuradas eram pouco polares. Com isso, todas as substâncias muito polares que estivessem presentes no extrato metanólico e de metanol:água seriam eliminadas mesmo antes de serem fracionadas em coluna de sílica flash. A fração E não foi eluída em coluna de sílica, pois, como já foi dito, estava sendo utilizada como uma fração controle positivo da presença das substâncias fungitóxicas no extrato aquoso.

As frações que possuíam substâncias de interesse, retiradas da coluna de sílica flash foram secas, pesadas e posteriormente desenvolvidas em cromatografia de camada delgada para análise dos Rf's (fig. 23). Desta vez, o método de revelação utilizado foi através de esporos do fungo *C. sphaerospermum* de acordo com Homans & Fuchs (1970).

Todas as frações provenientes da coluna de sílica foram dissolvidas em 400 µl de clorofórmio, sendo que a quantidade aplicada em cromatoplaca foi correspondente a 3,75% da massa seca total de cada amostra.

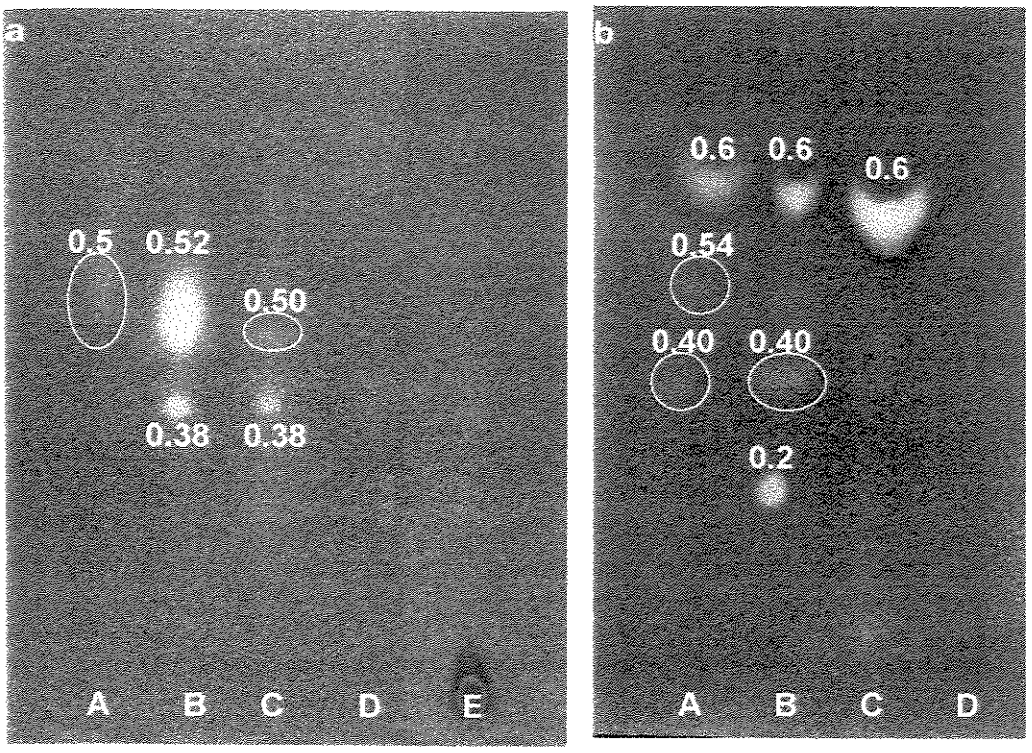


Figura 23. Bioautografia das frações da coluna de sílica para purificação do (a) extrato metanólico e (b) do extrato metanol:água. Na figura a - (A) corresponde ao eluente clorofórmio; (B) ao eluente clorofórmio:metanol (98:2); (C) ao clorofórmio:metanol (95:5); (D) clorofórmio:metanol (90:10) e (E) metanol. Na figura b - (A) corresponde ao eluente clorofórmio; (B) ao eluente clorofórmio:metanol (98:2); (C) corresponde ao clorofórmio:metanol (90:10) e (D) metanol. Os números em branco indicam o Rf de cada substância.

Através da figura 23a, pode-se notar que no eluato metanólico da coluna de XAD-2 existem 2 substâncias fungitóxicas de Rf's distintos. A fração de clorofórmio (A) possui 1 substância fungitóxica com Rf= 0,52, levemente visível. A fração de clorofórmio:metanol (98:2) (B) possui a mesma substância de Rf= 0,52, porém em maior concentração que na fração clorofórmio:metanol (98:2) (A), e outra com Rf= 0,38, que também é revelada na fração C, porém em menor concentração que a fração B. A fração C possui uma substância fungitóxica de Rf= 0,50, que acredita-se ser a mesma substância de Rf= 0,52 das frações A e B. As frações de D e E não mostraram a presença de substâncias fungitóxicas.

A figura 23b mostra que no extrato metanol:água (1:1) da coluna de XAD-2 existem 4 substâncias fungitóxicas de Rf's diferentes. A fração A possui 3 substâncias

fungitóxicas com Rf's 0,40, 0,54 e 0,68. A fração B, possui 3 substâncias fungitóxicas com Rf's 0,23, 0,4 e 0,66. A fração C possui somente 1 substância com Rf= 0,65. Nota-se que as frações A, B e C possuem substâncias com Rf's semelhantes(0,65; 0,66 e 0,68), devendo tratar-se de frações de composição similar, porém com substâncias de interesse em quantidades diferentes. Além disso, as frações A e B possuem mais uma substância que apresenta o mesmo Rf=0,4. A fração de metanol (D) não possui as substâncias fungitóxicas.

Com isso foi possível concluir que na verdade existem pelo menos três substâncias fungitóxicas nos exsudados de sementes de *S. marginata* e não apenas duas como inicialmente se pensava. A alta atividade inibidora dessas substâncias sugere a existência de um importante mecanismo de proteção das sementes e da plântula nos estádios iniciais do seu desenvolvimento. Essa alta atividade possivelmente compensa a pequena quantidade, uma vez que os rendimentos revelaram que substâncias aparecem em quantidades tais que dificultam a obtenção das quantidades necessárias à sua caracterização química.

As frações provenientes dos extratos metanólico e de metanol:água (1:1) foram submetidas a análises de HPLC e RMN ^{1}H, apresentando resultados que mostraram contaminação por ftalato, não sendo possível caracterizá-las quimicamente. Sendo assim, foram feitas alterações nas estratégias de extração e purificação das substâncias fungitóxicas, na tentativa de se obter maior rendimento e ausência de contaminação por ftalato.

2. Substâncias fungitóxicas de sementes intactas

Considerando a necessidade da obtenção de maior quantidade de substâncias fungitóxicas e com maior grau de pureza, foi realizada uma extração a partir de aproximadamente 16.700 sementes intactas de *S. marginata* com 48 horas de germinação. Estes extratos foram concentrados até a secura e suas massas foram determinadas. Em seguida, uma alíquota de cada extrato foi analisada por cromatografia de camada delgada e revelada com esporos de fungos, para confirmação da presença das substâncias fungitóxicas nos extratos (Fig. 24).

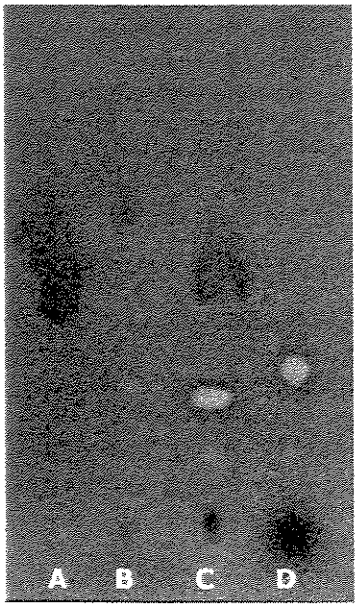


Figura. 24. Bioautografia dos extratos de hexano (A), clorofórmio (B) clorofórmio:metanol (9:1) (C) e metanol (D) , obtidos a partir de sementes integras de *S. marginata*. A cromatoplaca foi desenvolvida em clorofórmio:metanol (9:1 v/v) e revelada com esporos de fungos *Cladosporium sphaerospermum*. As zonas claras correspondem à presença de substâncias inibidoras do crescimento de fungo revelador.

Pela figura 24, observa-se que apenas os extratos de clorofórmio:metanol (9:1) e metanol apresentaram atividade inibidora de crescimento de fungos. Optou-se por iniciar o processo de purificação das substâncias de interesse pelo extrato metanólico, já que este possuía aparentemente atividade fungitóxica mais intensa. O

fracionamento e purificação da substância presente no extrato metanólico foi feita de acordo com fluxograma (fig. 20).

Inicialmente, o extrato metanólico foi submetido à cromatografia em coluna de sílica e os solventes utilizados no desenvolvimento da cromatografia em coluna foram clorofórmio (da fração 1 a 44), clorofórmio:metanol (98:2 v/v) (da fração 45 a 101), clorofórmio:metanol (95:5 v/v) (da fração 102 a 148) e clorofórmio:metanol (9:1v/v) (da fração 149 a 178).

Depois de coletadas, as frações foram secas e pesadas tendo uma massa total de 265 mg. Em seguida foi realizado monitoramento das frações através de aplicação em placas cromatograficas, seguido de revelação com esporos de fungo (Fig. 25).

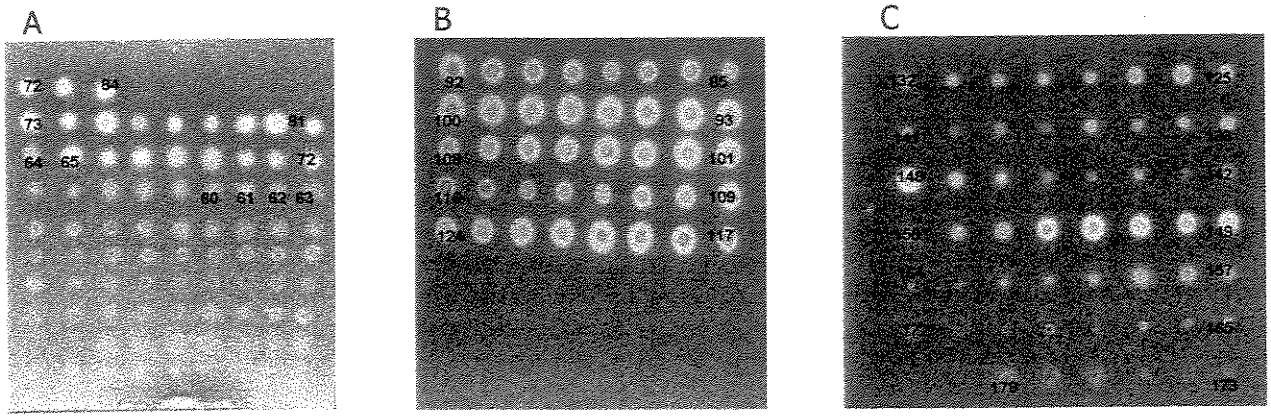


Figura 25. Bioautografias das frações da coluna de sílica para biomonitoramento. (A) frações de 1-84; (B) frações de 85-124; e (C) 125- 178.

De acordo com o monitoramento realizado (fig. 25), pode-se notar que substâncias fungitóxicas foram liberadas da coluna principalmente entre as frações 93 e 126 e 148 e 155. Estas frações são as de clorofórmio:metanol (98:2) (da fração 45 a 101), clorofórmio:metanol (95:5) (da fração 102 a 148) e clorofórmio:metanol (90:10) (da fração 149 e 178). Estes solventes possuem uma polaridade média.

Após monitoramento, as frações entre 60 e 178 foram analisadas em cromatografia de camada delgada analítica. As placas foram reveladas com iodo e as frações que possuíam perfis cromatograficos semelhantes foram reunidas dando origem aos grupos A, B, C, D, E, F, G_1, G_2, G_3, H, I, J, K, L e M. Estes grupos foram

analisados por cromatografia de camada delgada e esta revelada com esporos de fungos (fig. 26).

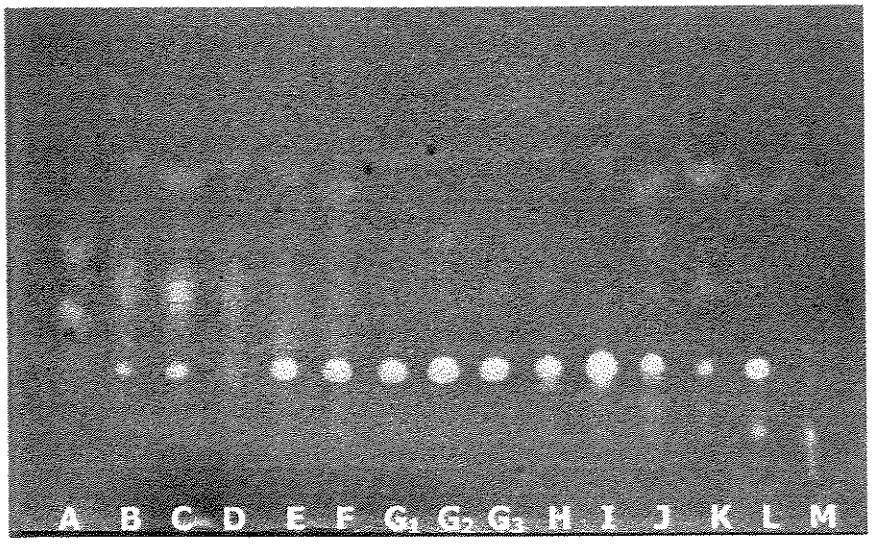


Figura 26. Bioautografia das frações reunidas segundo perfis cromatográficos resultantes de revelação com iodo, realizada anteriormente. As letras correspondem às frações reunidas da coluna de sílica.

Pelos perfis cromatográficos apresentados na figura 26, pode-se notar que os grupos E, F, G_1, G_2, G_3, H, I, J, K, L foram os que apresentaram a presença de uma substância fungitóxica com o mesmo Rf. Estes grupos de frações foram desenvolvidos individualmente em cromatografia de camada delgada preparativa para purificação. As placas utilizadas tinham 20 cm de base e 10 cm de altura, com 0,25 mm de espessura, com gel de sílica 60 com fluoresceína. O solvente utilizado no desenvolvimento das placas foi clorofórmio:metanol (9:1). Após o desenvolvimento das placas, suas laterais foram cortadas e reveladas com esporos de fungo (de acordo com item 1.4 deste relatório). Após o desenvolvimento das placas cromatográficas, com o auxilio das laterais das placas reveladas com esporos de fungos e da visualização das placas sob luz ultravioleta em comprimento de onda 254 nm, foi possível localizar a substância de interesse e eluí-las da sílica, raspando as placas e lavando a sílica por 24 horas no sistema de solventes clorofórmio:metanol (1:1). Em todas as placas utilizadas, o material reeluído da sílica tinha o mesmo Rf e foi reunido para determinação de sua massa (50 mg). Esse material foi analisado em HPLC.

Primeiramente, uma alíquota de 5 mg/ml do material proveniente das cromatografias preparativas de camada delgada, foi analisada por HPLC em sistema Varian, em coluna C18 semi-preparativa. O perfil cromatográfico resultante desta análise foi o agrupamento de picos que foram coletados (fig. 27).

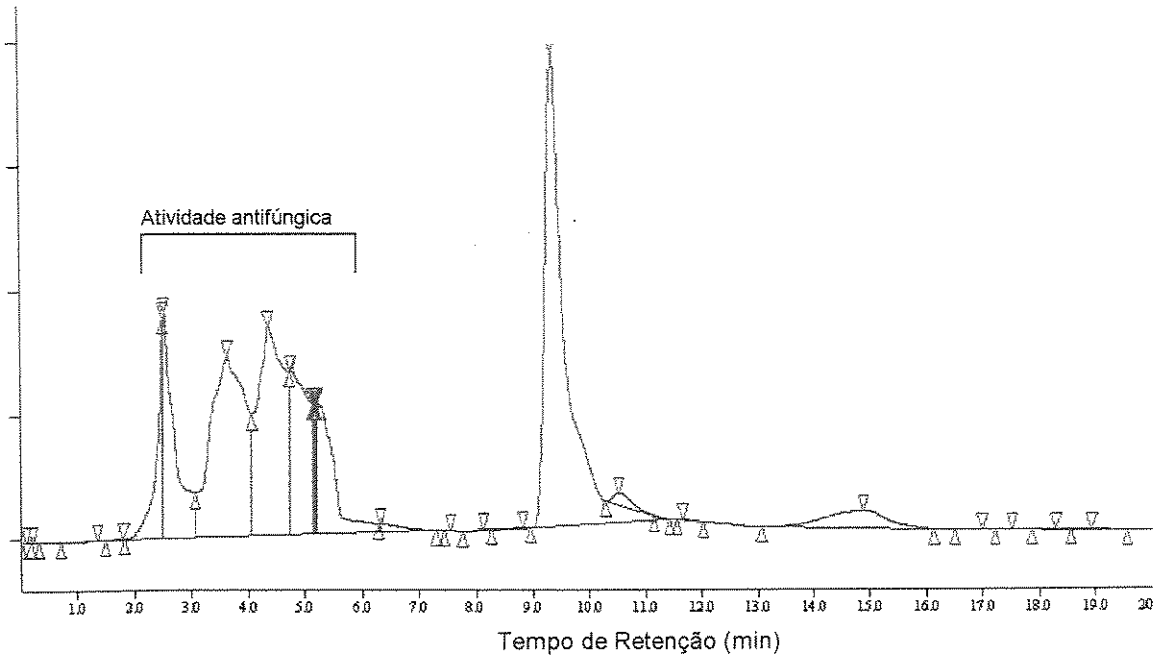


Figura 27. Perfil cromatográfico em HPLC da reunião de amostras provenientes de cromatografia de camada delgada preparativa. As frações foram coletadas de acordo com o tempo de retenção das substâncias, sendo(A) a fração coletada entre 0 e 2 min; (B) 2 e 4 min; (C) 4 a 6 min; (D) 6 a 8 min; (E) 8 a 10 min; (F) 10 a 12 min; (G) 12 a 14 min; (H) 14 a 16 min; (I) 16 a 18 min e (J) 18 a 20 min.

As frações coletadas, de acordo com o tempo de retenção, foram aplicadas em placas cromatográficas e reveladas com fungos com o objetivo de se detectar as frações com atividade fungitóxica (Fig. 30).

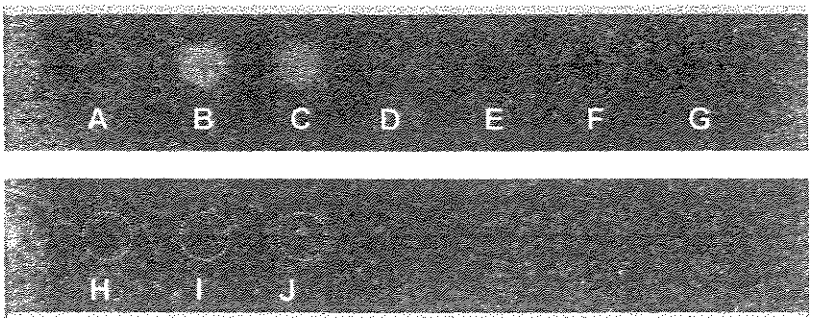


Figura 28. Bioautografia de frações coletadas em HPLC, em coluna C-18 semi-preparativa, sendo (A) a fração coletada entre 0 e 2 min; (B) 2 e 4 min; (C) 4 a 6 min; (D) 6 a 8 min; (E) 8 a 10 min; (F) 10 a 12 min; (G) 12 a 14 min; (H) 14 a 16 min; (I) 16 a 18 min e (J) 18 a 20 min.

Através da figura 28 pode-se notar que as únicas frações coletadas por HPLC que tiveram atividade inibidora de crescimento de fungos foram B e C, correspondentes aos tempos de retenção 2 a 4 min e 4 a 6min.

O próximo passo dado foi aplicar todo o restante da amostra em HPLC semi-preparativo, nas mesmas condições citadas anteriormente. As frações foram coletadas de maneira diferente. Ao invés de coletar frações de 2 em 2 min, as coletas foram realizadas em tempos de retenção diferenciados. Levando-se em consideração o perfil cromatográfico mostrado na figura 27, as coletas foram feitas da seguinte forma: a primeira fração foi coletada entre os tempos de retenção 0 e 2 min (HPLC1); em seguida foi realizada a coleta do material retido entre 2 e 6 min de retenção (HPLC2);depois entre 6 a 9 min (HPLC3); entre 9 a 13 min (HPLC4) e finalmente entre 13 a 20 min (HPLC5).

As frações HPLC1, 2, 3, 4 e 5, foram secas e suas massas foram determinadas (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimento das frações de HPLC, provenientes de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato metanólico. A fração HPLC2 em negrito, constituída do material com tempo de retenção 2 a 6 min, é a fração que possui atividade fungitóxica.

Frações de HPLC	***Rendimento das frações (mg)***
HPLC1 (0 a2 min)	0,7
HPLC2 (2 a 6 min)	**4,4**
HPLC3 (6 a 9 min)	4,7
HPLC4 (9 a 13 min)	16,1
HPLC5 (13 a 20min)	8,6
Total	***34,5 mg***

Foram aplicados em HPLC cerca de 49 mg de substância. O rendimento total da coleta em coluna semi-preparativa foi de 34,5 mg (tabela 2). Este valor representa 70,4 % da massa aplicada inicialmente.

A quantidade de material parcialmente purificado obtido pela análise por HPLC, em coluna semi-preparativa foi pequena, entretanto suficiente para análises preliminares em RMN ^{1}H e ^{13}C. De acordo com informações fornecidas pelo Prof. Dr. Massuo J. Kato, o espectro de RMN de ^{1}H obtido para a amostra indicou que a substância possui natureza graxa. Os principais sinais foram observados em 1,25 δ, correspondente a cadeia metilênica alifática e 0,84 δ, correspondente a metila terminal. Não foram observados sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos, mas outros sinais de baixa intensidade que podem ser atribuídos à presença de impurezas. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais compatíveis com a natureza alifática, especialmente o referente a carbonos metilênicos em 29,7 δ; o carbono metílico apresentou sinal em 14,1 δ e os outros sinais em 31,9, 29, 4 e 22,7 δ podem ser atribuídos aos carbonos α, β e γ ao carbono carboxílico (dados não mostrados). Outras informações relacionadas à presença de ácidos carboxílicos livres ou de ésteres ou quanto ao tamanho da cadeia alifática somente poderão ser obtidas através dos dados de infra-vermelho (IV) e de espectro de massas (EM).

DISCUSSÃO

Desde a germinação da semente e em todas as fases do seu ciclo de vida, as plantas encontram-se expostas ao ataque de predadores e microrganismos. Para muitas espécies, a germinação da semente é um evento de fundamental importância, pois garante sua perpetuação. Seu alto valor nutritivo e a dependência das condições ambientais restritas fazem das sementes elos frágeis do ciclo de vida dos vegetais. Para garantir seu estabelecimento e sobrevivência, algumas sementes possuem substâncias de defesa constitutivas.

Segundo Paxton (1995), partes cruciais das plantas, como as sementes, acumulam compostos constitutivos que podem servir como o primeiro obstáculo para o ataque de insetos e patógenos. Falhando completamente esta estratégia, esses compostos podem então ser convertidos em outros de maior toxicidade, servindo de estratégia secundária de defesa.

Braga & Buckeridge (1997), estudando sementes de *Sesbania marginata*, detectaram açúcares na água de germinação. No final do processo de germinação, a protrusão da radícula provoca rachaduras e fissuras na testa das sementes e parte do carboidrato de reserva, dos produtos de sua degradação e de oligossacarídeos da série rafinósica é exsudada para o meio. Mesmo com a presença destes compostos na água de germinação não foi observado o crescimento de fungos sobre as sementes, nem na região onde estas estavam. A explicação para este fato é a presença de substâncias altamente fungitóxicas, tanto nos exsudados das sementes (Braga & Buckeridge, 1997; Rahal et al., 2000), quanto nos cotilédones (Astarita et al., 1999). A presença destes compostos nos cotilédones e logo após nos exsudados das sementes sugere a ocorrência de difusão destas substâncias através do endosperma e testa. Este processo de difusão está intimamente ligado à hidratação do endosperma mediada por galactomanano, demonstrando mais uma vez o importante papel desse polissacarídeo na regulação do balanço hídrico da semente e na solubilização de seus componentes.

Pelas análises realizadas, foi possível observar que *S. marginata* possui substâncias fungitóxicas já nas sementes quiescentes, caracterizando a existência de defesa química constitutiva. Além disso, ao longo do processo de germinação, ocorre um incremento bastante grande na exsudação de uma dessas substâncias, sugerindo

que possa estar havendo indução de sua síntese. Considerando os resultados apresentados no Capitulo I, que trata da detecção de atividade indutora de fitoalexinas nos endospermas de *S. marginata* durante a germinação, é possível supor que essas moléculas eliciadoras possam estar relacionadas ao aumento no teor dessas substâncias fungitóxicas exsudadas pela semente. Por outro lado, esse aumento pode estar relacionado a outros processos bioquímicos que não foram considerados no presente trabalho.

Sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá), estudadas em nosso laboratório, também possuem, em seus cotilédones, substâncias fungitóxicas que são exsudadas para o meio de cultura durante a germinação. Essas sementes acumulam grandes quantidades de xiloglucano como principal polissacarídeo de reserva. Isso sugere que, talvez, sementes com altos teores de carboidratos possuam uma estratégia de defesa comum contra ataque de microrganismos, embora tal sugestão só poderá ser confirmada quando maior número de espécies que estocam carboidratos de reserva de parede celular for estudado com relação à produção e liberação de substâncias antifúngicas.

Os exsudados de *S. marginata* também mostraram atividade alelopática em sementes de alface, inibindo o crescimento de suas radículas (Braga & Buckeridge, 1997). O ácido abicísico proveniente de diversas sementes (leguminosas e não-leguminosas) tem sido descrito como um potente inibidor de germinação de sementes de alface, quando exsudado para o meio (Halmer & Bewley, 1979; Dulson et al., 1988). Potomati (2000) detectou a presença de ácido abcísico em sementes de *S. marginata*. Estas informações sugerem que o ácido abicísico pode ser responsável pela inibição do crescimento das radículas de alface quando sementes dessa espécie foram colocadas para germinar com o exsudado de sementes de *S. marginata*, efeito alelopático observado por Braga & Buckeridge (1997). Ou seja, além dos constituintes dos exsudados não permitirem o desenvolvimento do fungo *Cladosporium sphaerospermum*, alguns deles também possuem potencial alelopático. Algumas espécies vegetais possuem potencial alelopático e também mostraram atividade antifúngica para *Cladosporium cladosporioides, Alteranaria tenuis, Bottrydiplodia*

thebromae, Aspergillus sp., Fusarium sp., Colletotricum gloeosporioides e Cercospora nicotianae (Bordoloi et al., 1985; Mcdonald et al. 1994).

Neste trabalho, foram realizadas duas tentativas de purificação das substâncias fungitóxicas provenientes de sementes de *S. marginata.* Nas duas, o rendimento das frações ativas sobre o crescimento e desenvolvimento do fungo *Cladosporium sphaerospermum*, foi baixo. Entretanto, a atividade inibidora foi bastante alta, mesmo em ensaios biológicos nos quais foram aplicados 30 μg de extrato impuro (fig. 22). Essa relação dose x resposta pode ser explicada, levando-se em consideração que essas substâncias são compostos do metabolismo secundário e que usualmente são produzidas em pequenas quantidades pelo vegetal; sua atividade possivelmente compensa sua presença em pequenas quantidades, uma vez que os rendimentos revelaram que essas substâncias aparecem em quantidades tais que dificultam sua caracterização química.

As substâncias fungitóxicas presentes na água de germinação e nas sementes intactas possuem polaridade média, uma vez que interagem com solventes de grau médio de polaridade (clorofórmio:metanol (9:1)). Não são visíveis sob luz U.V., descartando-se a possibilidade de se tratarem de flavonóides ou outros compostos de origem fenólica. Há suspeitas que as substâncias exsudadas na água de germinação sejam terpenóides, mas seus RMN's não foram conclusivos pois possuiam contaminação com ftalato.

Os terpenóides constituem um grupo muito grande e importante de compostos secundários, que são formados por uma simples unidade que se repete, a unidade isoprenóide. Essa unidade, através de rearranjos, ciclizações e perda ou ganho de unidades de isopropreno, dá origem a compostos como os carotenóides e muitos outros terpenos (Dey & Harborne, 1997). Triterpenóides antifúngicos constitutivos de plantas superiores foram descritos e identificados em *Mollugo pentaphylla, Ecballium elaterium e Chisocheton paniculatus* (Grayer & Harborne, 1994). Em folhas de *Morithamnus crassus*, família Asteraceae, a partição com hexano/AcOEt levou ao isolamento e identificação de diterpenos com atividade fungitóxica para o fungo *Cladosporium sphaerospermum* (Silva et al., 2000).

Além dos terpenóides, outras classes de compostos tais como saponinas, glicosídeos cianogênicos e os glucosinolatos vêm sendo descritas como substâncias antifúngicas (Harborne, 1999).

Naviner et al. (1999), descreveram ácidos graxos inibidores do desenvolvimento e crescimento de *Listonella anguillarum*, presentes em extratos orgânicos de *Skeletonena costatum,* uma alga marinha. Ácidos graxos insaturados e saturados, foram descritos por Nieman (1954) e Galbraith & Miller (1973a, b e c), como inibidores de crescimento de bactérias (citado por Naviner et al., 1999). O ácido 13-hidroxi-octadecatrienóico, um dos ácidos graxos extraídos de sementes de *Oryza sativa,* foi descrito como uma fitoalexina fungitóxica (Stössel, 1986). Como já dito anteriormente, foram feitas análises de RMN de prótons no material proveniente das sementes intactas. Os principais compostos constituintes da amostra foram identificados como ácidos graxos. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de que ácidos graxos provenientes das sementes sejam fungitóxicos, não permitindo o desenvolvimento do fungo *Cladosporium sphaerospermum* sobre a semente ou em seus arredores.

Os mecanismos de defesa, principalmente em sementes, são importantes para o desenvolvimento e perpetuação de espécies vegetais. Como já mencionado, durante a germinação de sementes de *S. marginata* é exsudada grande quantidade de açúcares na água de germinação. Estes açúcares representam uma fonte nutricional para o desenvolvimento de microorganismos. Contudo, além da exsudação de açúcares na água de germinação, alguns compostos de defesa são também liberados. Sem a ação destes compostos antifúngicos e outros compostos antimicrobianos, estas sementes fatalmente não conseguiriam se estabelecer no meio ambiente altamente competitivo, o que consequentemente, comprometeria o sucesso desta espécie vegetal.

CONCLUSÕES

Moléculas com atividade eliciadora de síntese de fitoalexinas estão presentes no endosperma de sementes de *S. marginata*, sendo mais ativas nos extratos do 5º dia de germinação. Os resultados obtidos sugerem fortemente que estas moléculas são produtos da degradação do galactomanano, na forma de oligossacarídeos com grau de polimerização de 2 a 7, ou seja, contendo 2 a 7 resíduos de açúcar. Após hidrólise de duas frações provenientes de extratos do 4º e 5º dias de germinação, foram obtidos fortes indícios de que oligossacarídeos constituídos de 2 resíduos de manose e 1 de galactose, presentes em uma das frações hidrolisadas, podem ser os responsáveis pela atividade indutora observada durante a germinação da semente. Além disso, a confirmação de que oligossacarídeos de galactomanano estão participando em estratégias de defesa sugere que o carboidrato de reserva, além de servir de fonte de carbono no processo inicial da germinação dessa espécie, está diretamente ligado a outros processos de seu metabolismo, sendo uma molécula multifuncional.

Foi detectada a presença de pelo menos 3 substâncias fungitóxicas exsudadas pelas sementes de *S. marginata*. Todas possuem alta atividade, embora estejam presentes em pequenas quantidades, fato que dificultou grandemente sua caracterização química.

Do ponto de vista fisiológico, as sementes estudadas parecem possuir mecanismos de defesa que estão presentes em sementes quiescentes, e que também são ativados em sementes germinantes, garantindo a germinação livre de contaminação por fungos e facilitando o desenvolvimento e estabelecimento da futura plântula. Tais mecanismos parecem estar diretamente relacionados à mobilização das reservas de carboidratos da semente, garantindo o estabelecimento e a sobrevivência da espécie em um ambiente altamente competitivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G., McNEIL, M., VALENT, B.S., SHARP, J.K. & NOTHNAGEL, E. A. 1983. Oligosaccharins: naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions. *In* Structure and function of plant genome. O. Ciferri & L. Dure, (eds), Plenum. Pub. Corp. New York. p. 293-312.

ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G., AUGUR, C., CHEONG, J., EBERHARD, S., HAHN, M., MARFÁ, V., MOHNEN, D., O'NEILL, M.A., SPIRO, M.D. & YORK, W.S. 1992. Oligosaccharins: Oligosaccharide regulatory molecules. Adv. Chem. Res. 25: 77-83.

ALDINGTON, S. & FRY, S.C. 1993. Oligosaccharins. Adv. Bot. Res. 19: 1-19.

ALBERSHEIM, P., FRESHOUR, G., FULLER, M.S., GUILLEN, R. , HAM, K.S., HAHN, M.G., HUANG, J., O'NEIL, M., WHITCOMBE, A., WILLIAMS, M.V., YORK, W.S. & DARVILL, A. 1999. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. Adv. Struct. Glycobiol. 22:374-378.

ALMEIDA, F.S, 1988. A alelopatia e as plantas. IAPAR. Londrina.

ALMEIDA, F.S, 1991. Controle de plantas daninhas em plantio direto. IAPAR. Londrina.

ASPINALL, G.O. 1981. Construction of plant cell wall polysaccharides. *In* Encyclopedia of Plant Physiology. Plant Carbohydrates II. W. Tauner, F.A. Loweus (eds). Spring-Verlag. New York. p 3-8.

ASTARITA, L.V., PESSONI, R.A.B., BUCKERIDGE, M.S. & BRAGA, M.R.,1999. Substâncias fungitóxicas em tecidos isolados de *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). Programa e resumos. XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. p.110.

AUXTOVÁ, O., LISKOVÁ, D., KAKONIOVÁ, D., KUBACKOVÁ, M., KARACSONYI, S. & BILISCS, L. 1995. Effect of galactoglucomannan derived oligosaccharides on elongation growth of pea and spruce stem segments stimulated by auxins. Planta 196: 420-424.

AVIGAD, G. 1982. Sucrose and others disaccharides. *In* Encyclopedia of Plant Physiology. F. A. Loewus & W. Tanner (eds), Spring-Verlag. Berlin. p. 217-347.

AYERS, A., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. & ALBERSHEIM, P. 1976 (a). Host-pathogen interactions IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization

of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. sojae. Plant. Physiol. 57: 751-759.

AYERS, A., EBEL, J., VALENT, B & ALBERSHEIM, P. 1976 (b). X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from mycelial walls of *Phytophthora megasperma var sojae*. Plant. Physiol. 57: 760-765.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Sprin-Verlag. New York.

BEWLEY, J.D. & REID, J.S.G. 1985. Mannans and glucomannans. *In* Biochemistry of storage carbohydrates. P.M. Dey & R.A. Dixon (eds). Academic Press. London. p. 289-304.

BORDOLOI, M. J., SHUKLA, V.S. & SHARMA, R. P., 1985. Absolute stereochemistry of the insect antifeedant. Tetrahed. Lett. 26: 509-510.

BRAGA, M.R. & BUCKERIDGE, M.S. 1997. Fungitoxic compounds exsudated by seeds of *Sesbania marginata* Benth.(Leguminosae) following germination. Programa e resumos da XXVI[a] Reunião Anual da SBBq. E-76, p 41.

BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 10: 79-84

BRAGA, M.R., COSTA, A.P.P. & DIETRICH, S.M.C. 1993. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. Ciên. Cult. 45: 76-80.

BRETT, C. & WALDRON, K. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls. *In* Topics in plant physiol. 2. Unwin Hyman, London.

BRYANT, J.A. 1985. Seed Physiology. Edward Arnold Pty Ltd, Southampton, Australia.

BUCKERIDGE, M.S & DIETRICH, S.M.C. 1990. Galactomannan from Brazilian legume seeds. Rev. brasil. Bot. 13: 109-112.

BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germination seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). Plant. Sci. 117: 33-43.

BUCKERIDGE, M.S. & REID J. S. G. 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. Ciên. Cult. 48:153-162.

BUCKERIDGE, M.S., ROCHA, D.C., REID, J.S.G., & DIETRICH, S.M.C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. Physiol. Plant. 86: 145-151.

BUCKERIDGE, M.S., PANEGASSI, V.R., DIETRICH, S.M.C. 1995. Storage carbohydrate mobilization in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae). Phytochemistry 38:871-875.

BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H. P. & TINÉ, M.A. 2000. Mobilisation of storage cell wall pollysaccharides in seeds. Plant. Physiol. Biochem. 38:141-156.

CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical property of the walls during growth. Plant J. 3:1-10.

CERVONE, F., HAHN, M.G., DE LORENZO, G., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P., 1989. Plant-Patogen Interactions. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into a elicitor of plant defense responses. Plant Physiol. 90: 542-548.

CORDEIRO NETO, F. & DIETRICH, S.M.C. 1992. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. Ciên. Cult. 44: 342-344.

CRUICKSHANK, I.A.M & PERRIN, D.R., 1960. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. Nature 187:799-800.

DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:243-375.

DARVILL, A.G., AUGUR, C., BERGMAN, C., CARLSON, W., CHEONG, J. J., EBERHARD, S. & HAHN, M.G. 1992. Oligossacharins - oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. Glycobiology 2: 181-198.

DEY, P.M. 1980. Biochemistry of alpha-D-galactosyl linkages in the plant kingdom. Adv. Carb. Chem. Biochem. 37:283-372.

DEY, P.M. & HARBORNE J.B. 1997. Plant Biochemistry. Academic Press. New York.

DIRK, L.M.A., VAN DER KROL, A.R. VREUGDENHIL, D., HILHORST, H.W.M & BEWLEY, J.D. 1999. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization

following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. Plant. Physiol. Biochem. 37: 41-50.

DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-355.

DULSON, J., BEWLEY, J.D. & JOHNSON, R.H. 1988. Abscisic acid is an endogenous inhibitor in the regulation of mannanase production by isolated lettuce endosperms. Plant Physiol. 87:660-665.

DURIGAN, J.C. & ALMEIDA, F.L.S. 1993. Noções sobre alelopatia. UNESP. Jaboticabal.

EBERHARD, S., DOUBRAVA, N., MARFÁ, V., MOHENEN, D., SOUTHWICK, A., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. Plant Cell 1: 747-755.

EINHELLIG, F.A., 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. *In* The science of allelopathy. A.R. Putnam & C.S. Tang (eds). John Wiley and Sons. New York. p. 171-188.

FILISETTI-COZZI, T. M. C. C. & CARPITA, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Anal. Biochem. 197: 157-162.

FISHER, N.H., WEIDENHAMER, J. D. & BRADOW, J.M. 1989. Inhibition and promotion of germination by several sesquiterpenes. J. Chem. Ecol. 15: 1789-1793.

FRY, S.C. 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Ed. Longman Scientific & Tech., New York.

FRY, S.C., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J.P., JATO, Y., LORENCES, E.P., MAcLACHLAN, G. A., McNEIL, M., MORT, A.J., REID, J.S.G., SEITZ, H.U., SELVENDRAN, R.R., VORAGEN, A. G.J. & WHITE, A.R., 1993. An unambigous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. Physiol. Plant. 89:1-3.

GOLLIN, D.J., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Plant cell fragments inhibit flowering and promote vegetative growth in *Lemna gibba*. Biol. Cell. 51: 275-280.

GÓMEZ, L.D., BRAGA, M.R & DIETRICH, S.M.C. 1994. Involvement of active oxygen species and peroxidases in phytoalexin production induced in soybean hypocotyls by an elicitor from a saprophytic fungus. Ciên. Cult. 46:153 –155.

GOMIDE, M.D. 1993. Potencialidades alelopáticas dos restos culturais de dois cultivares de cana de açúcar (*Saccharum sp.*), no controle de algumas de plantas daninhas. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba 99 p.

GOVINDACHARI, T.R., SURESH, G., GOPALAKEISHMAN, G., BANUMATHY, B & MALASILAMANI, S. 1998. Identification of antifungical compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. Phytoparasitica 26:109-116.

GRAYER, R.J. & HARBORNE, J.B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. Phytochemistry 37: 19-42.

HAHN, M. G., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen interations. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation on soybeans. Plant. Physiol. 68: 1161-1169.

HAHN, M.G., BUCHELI, P., CERVONE, F., DOARES, S.H., O´NELL, R.A., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P., 1989. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. *In* KOSUGE T. & NESTER E.W. (eds). Plant-microbe Interactions, vol. 3. Molecular and genetic perspectives. McGraw-Hill Inc. New York. p. 131-181.

HALMER, P. 1985. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. Physiol. Veg. 23:107-125.

HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannase production by the lettuce endosperm. Control by the embryo. Planta 144: 330-340.

HARBORNE, J.B., 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3rd ed. Academic Press. London.

HARBORNE, J.B., 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Biochem. Syst. Ecol. 27:335-367.

HARGREAVES, J.A. & BAILEY, J.A., 1978. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* released by damaged bean cells. Physiol. Plant Pathol. 13:89-100.

HOMANS, A.L. & FUCHS, A. 1970. Direct autography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. J. Chromatog. 51: 325-327.

INGHAM, J.L., 1982. Phytoalexins from Leguminosae. *In* Phytoalexins. Bailey J.A. & Mansfield J.W. (eds). Blackie, London.

LI, H.H., NISHIMURA, H., HASEGAWA,K. & MIZUTANI, J. 1992. Allelopathy of *Sasa cernua*. J. Chem. Ecol. 18:1785-1796.

LIN, Z., HOULT, J.R.S, BENNET, D.C. & RAMAN, A. 1999. Simulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. Planta Med. 65: 600-603.

LOVETT, J.V. 1986. Allelopathy: the Australian experience. *In* PUTNAM, A.R. & TANG, C.S. (eds). The science of allelopathy. Jonh Wiley and Sons. New York. p. 75-99

LUCCHESI, A.A. & OLIVEIRA, R.F. 1988. Efeito inibitório na germinação, induzido pelo extrato de couve *(Brassica oleraceae* L. var. acephala DC.). Anais da Escola Superior Luiz de Queiroz. Piracicaba. 45:167-178.

MAYER, A.M. & POLJKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. P.F. Warein & A.Y. Galston. *In* ed. Pergamon Press. Great Britain. 192p.

McCLEARY, B.V. 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar. Phytochemistry 22: 649-658.

McDONALD, G. E., BRECKE, B. J., COLVIN, D. L. & SHILLING, D. G., 1994. Chemical and mechanical control of dogfennel (*Eupatorium capillifolium*). Weed Technol. 8:483-487.

NEUKON, H. 1989. Galactomannans: properties and aplications. Leben. Wiss. Tech. 22: 41-45.

NIDIRY, E.S.J. 1999. Antifungical activity of tomato seed extracts. Fitoterapia 70:181-183.

NOTHNAGEL, E.A., McNEIL, M & DELL, A. 1983. Host-pathogen interactions XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell wall elicits phytoalexins. Plant Physiol. 71:916-926.

PARMAR, V.S., JAIN, S.C., BISHT, K.S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O.D., PRASAD, A.K., WENGEL, J., OLSEN, C.E. & BOLL, P.M., 1997. Phytochemistry of the genus *Piper.* Phytochemistry. 46: 597-673.

PAXTON, J., 1995. Soybean phytoalexins: elicitation, nature, mode of action, and role. *In* Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. Daniel & Purkayastha, eds. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 69-83.

PINO, J.A. & BORGES, P. 1999. Los componentes volatiles de las especias. Alimentaria 2:47-53.

POWELL, R.G.; SMITH Jr, C.R.; WEISLEDER, D.; MATSUMO G.K.; CLARDY, J. & KOZLOWSKI, J. 1983. Sesbanimide, a potent antitumor substance from *Sesbania drummondii* seed. J. Am. Chem. Soc. 105:3739-3741.

POTOMATI, A., 2000. Efeito do ácido abscísico sobre a mobilização de galactomanano e o desenvolvimento do embrião em sementes de *Sesbania marginata* Benth. (Disssertação de mestrado). Campinas. UNICAMP.

PUTNAM, A.R. & DUKE, W.B. 1978. Allelopathy in agroecossistems. An. Rev.Phytopathol.16: 431-451.

RAHAL, R.L., BRAGA, M.R. & BUCKERIDGE, M.S. 1998. Phytoalexin-inducing activity generated during galactomanan degradation in seeds of *Sesbania virgata*. Programa e resumos da XXVII[a] Reunião Anual da SBBq. E-14. p. 32.

RAHAL, R. L., BUCKERIDGE, M.S. & BRAGA, M.R. 2000. Carboidratos de reserva e as estratégias de defesa durante a germinação de sementes de *Sesbania marginata* Benth. Programa e resumos do I Simpósio Programa Biota/Fapesp. p. 116.

RASMUSSEN, J.A., HEJL, A.M., EINHELLI, F.A. & THOMAS, J.A., 1992. Sorgoleone from root exudates inhibits mitocondrial functions. J. Chem. Ecol. 18:197-207.

REID, J.S.G. 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L.(Legum.). Planta 100: 131-175.

REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic legume seed. Planta. 147: 145-150.

REID, J.S.G., 1985. Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seed gums and hemicelluloses. Adv. Bot. Res. 11:125-155.

RODRIGUES, L.R. A., RODRIGUES, T.J.D. & REIS, R.A., 1992. Alelopatia em plantas forrageiras. UNESP. Jaboticabal.

SCHERBUKHIN, V.D & ANULOV, O.V. 1999. Legume seed galactomannans (Review). Applied. Biochem. Microbiol. 35: 229-244.

SILVA, M.Q.O.R., YOUNG, M.C.M., BAUTISTA, H.P. & MARTINS, D. 2000. Substâncias fungitóxicas de *Morithamnus crassus*. Reunião Anual da SBQ. PN-041.

SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160:61-68.

STOËSSL, A. 1986. Secondary plant metabolites in plant disease resistance. II Phytoalexins. Fitopatol. brasil. 11: 25-53.

SWAIN, T. & HILLIS, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analyses of phenolic constituents. J. Sci. Food. Agric. 10: 63-38.

YORK, W.S., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elogation of pea stem segments by a xyloglucan oligossaccharide. Plant Physiol. 75: 295-297.

WESTERN, T.L; SKINNA, D.J. & HAUGHN, G.W. 2000. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopisis* seed coat. Plant Physiol. 122: 345-353.

VICKERY, M.L. & VICKERY, B., 1981. Secondary Plant Metabolism. MacMillan Press. London.

WEEDON, F.R., 1923. Certain features of chemical interest in the weed *Glottidium vesicarium*. Univ.Florida, Orlando.