

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

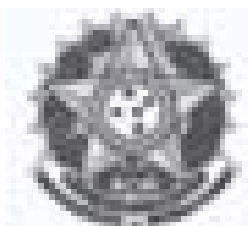
Análise dos níveis de poligalacturonases e glucanases expressas durante os processos de interação patogênica e saprofítica de *Sclerotinia sclerotiorum*.

SILVIO ROMERO COSTA BARBOSA

Orientação: Prof.ª Dr.ª Silvana Petrofeza da Silva

GOIÂNIA – GO

2008



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

Análise dos níveis de poligalacturonases e glucanases expressas durante os processos de interação patogênica e saprofítica de *Sclerotinia sclerotiorum*.

SILVIO ROMERO COSTA BARBOSA

Orientação: Prof.^a Dr.^a Silvana Petrofeza da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de mestre em Biologia. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

**GOIÂNIA – GO
2008**

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio a mim dedicado. Minha mãe pela valorização da vida. Meu pai pela organização e princípios, meus irmãos pela paciência. À Lígia, fochein.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

À professora Silvana Petrofeza, pela intensa dedicação ao trabalho, sendo modelo de persistência, profissionalismo, caráter e capacidade. Cresci com seu exemplo. Obrigado sempre.

Aos professores do curso e os colegas de laboratório.

Aos funcionários pelo carinho.

Índice

1. Introdução	1
1.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1
1.2 Distribuição geográfica	1
1.3 Epidemiologia	2
1.4 Processo de infecção	3
1.5 Patogênese	4
1.5.1 O ácido oxálico e os seus papéis na patogencidade	5
1.6 A atividade das enzimas hidrolíticas durante o processo de invasão	6
1.7 Ação das poligalacturonases	6
1.8 Ação das Beta glucanases	7
1.9 Modo de ação das beta glucanases em fungos	8
1.10 Propriedades da atividade das beta glucanases	8
1.11 Funções das beta glucanases	9
1.12 Produção de beta glucanases	10
2.0 Objetivos	11
2.1 Metas	11
3.0 Material e método	12
3.1 Linhagem e condições de cultivo	12
3.2 Estabelecimento do processo de infecção	12
3.3 Crescimento em meio com Pectina, Glicose e Extrato de parede	12
3.4 Precipitação com sulfato de amônio	13
3.5 Determinação de proteínas totais	13
3.6 Atividade de exopoligalacturonase	13
3.7 Atividade da Beta 1,3 glucanase	14
3.8 Atividade da Beta 1,4 glucanase	14
3.9 Análise da expressão gênica	14
3.9.1 Extração de RNA total de <i>S. sclerotiorum</i>	15
3.9.2 Desenho de Oligonucleotídeos para amplificação dos genes de interesse	16
3.9.3 RT PCR (transcriptase reversa)	16
3.9.4 Quantificação dos níveis de expressão gênica	17
4.0 Resultados	18
4.1 Condição de manutenção e cultivo de <i>S. sclerotiorum</i>	18
4.1.1 Estabelecimento do processo de infecção : <i>S. sclerotiorum</i> x feijoeiro	18
4.1.2 Crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> em meio mínimo	20
4.1.3 Monitoramento do pH do meio de cultura	20
4.2 Dosagem da atividade enzimática	21
4.2.1 Determinação de proteína total	21
4.2.2 Atividade das poligalacturonases	22
4.3 Atividade das beta glucanases	23
4.3.1 Atividade da beta 1,3 glucanase	23
4.3.2 Atividade da beta 1,4 glucanase	25
4.4 Análise da expressão gênica	27
4.4.1 Extração de RNA total	27
4.4.2 Processo de infecção plantas de feijoeiro com <i>S. sclerotiorum</i>	28
4.4.3 Indução com diferentes fontes de carbono	31
4.4.3.1 Pectina	31
4.4.3.2 Parede celular de feijoeiro	35
5.0 Discussão	39
5.1 O pH	39

5.2 Poligalacturonases	40
5.3 Beta glucanases	42
6.0 Conclusões	44
7.0 Perspectivas	45
8.0 Referências bibliográficas	47

Lista de Tabelas	ii
Lista de figuras	ii
Resumo	iv
Abstract	v

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados .	16
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Método do palito de dente	18
Figura 2 - Caule de feijão infectado por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
Figura 1 - pH do sobrenadante de cultura durante o cultivo de <i>S. sclerotiorum</i> sob diferentes fontes de carbono.	21
Figura 4 – Concentração de proteína total das amostras obtida com o método de Bradford.	22
Figura 5 - Atividade de poligalacturonases secretadas por <i>S. sclerotiorum</i> em diferentes condições de cultivo	23
Figura 6 - Atividade de beta 1,3 glucanases secretadas por <i>S. sclerotiorum</i> em sob condições de cultivo com pectina	24
Figura 7- Atividade de beta 1,3 glucanases secretadas por <i>S. sclerotiorum</i> em sob condições de cultivo com extrato de parede a 1%.	25
Figura 8 - Atividade de beta 1,4 glucanases secretadas por <i>S. sclerotiorum</i> em sob condições de cultivo com pectina a 1%	26
Figura 9 - Atividade de beta 1,4 glucanases secretadas por <i>S. sclerotiorum</i> em sob condições de cultivo com extrato de parede a 1%.	27
Figura 10 - Perfil eletroforético do RNA total extraído do fungo <i>S. sclerotiorum</i>	28

na interação com plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Figura 11- Análise da expressão de genes de poligalacturonase (PG), β - 1,3 29
Glucanase e β - 1,4 glucanase de *S. sclerotiorum* durante a interação com plantas
de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

Figura 12- Análise da expressão de genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase de *S.* 30
sclerotiorum durante a interação com plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

Figura 13- Análise da expressão de genes de poligalacturonase (PG), de *S. sclerotiorum* 33
durante o crescimento em meio de cultura contendo 1% de pectina.

Figura 14- Análise da expressão de genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase 34
de *S. sclerotiorum* durante o crescimento em cultura contendo pectina a 1%.

Figura 15- Análise da expressão de genes de poligalacturonase (PG), de *S. sclerotiorum* 37
durante o crescimento em meio de cultura contendo 1% de extrato de parede.

Figura 16- Análise da expressão de genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase 38
de *S. sclerotiorum* durante o crescimento em cultura contendo extrato de parede a
1%.

Resumo

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, pode interagir com uma grande gama de espécies vegetais bem como obedecer à alta especificidade e especialização patogênica. Ele é capaz de digerir a parede celular de plantas hospedeiras utilizando para tal uma série de mecanismos bioquímicos e morfogenéticos que otimizam a invasão. Várias enzimas são produzidas durante a interação planta-hospedeiro e dentre elas se destacam a família das poligalacturonases (PGs) e as beta glucanases. As PGs catalisam a hidrólise da ligação glicosídica α - 1-4 e as beta glucanases liberam glucanas e oligossacarídeos durante a hidrólise. Nosso trabalho procurou caracterizar, além do monitoramento do pH, a ação destas enzimas, bem como a expressão gênica durante a interação com feijão (*Phaseolus vulgaris*) e sob diferentes meios de cultivo, pectina a 1%, extrato de parede celular de plantas de feijoeiro a 1% e glicose 1%. As atividades foram medidas pelo método DNS onde mediu-se a quantidade de açúcares redutores no meio e a expressão gênica através de perfis eletroforéticos analisados após a técnica de RT-PCR. Os resultados mostraram variação da atividade das PGs na interação sendo o meio com pectina com maior expressão delas. As beta 1,3 e beta 1,4 glucanases foram expressas em ambos os meios de cultura propostos, contudo houve maior produção de beta 1,3 durante a invasão. A variação da expressão de tais enzimas em diferentes meios de cultura sugerem complexidade de rotas bioquímicas específicas para sua produção suscitando novas abordagens para o reconhecimento dos caminhos que promovem o desenvolvimento da doença.

Abstract

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* can interact with a great range of vegetable species as well as to obey to the discharge especificity and patogenic specialization . It is capable to digest the cellular wall of host plants using for such a series of biochemical mechanisms and morfogenetics that optimize the invasion. Several enzymes are produced during the interaction plant-host and among them they stand out the family of the poligalacturonases (PGs) and them beta glucanases. PGs catalyze the hydrolysis of the connection glycosídic bond - 1,4 and them beta glucanases liberate glucans and oligossacarídeos during the hydrolysis. Our work tried to characterize, besides the pH, the action of these enzymes, as well as the gene expression during the interaction with bean (*Phaseolus vulgaris*) and under different cultivation means, pectin 1%, wall extract 1% and glucose 1%. The activities were measured by the method DNS where the amount was measured of you sugar reducers in the middle and the gene expression through electrophoretic profiles analyzed after the technique of RT-PCR. The results showed variation of the activity of PGs in the interaction being the middle with pectin with larger expression of them. Them beta 1,3 and beta 1,4 glucanases were expressed in both culture means proposed, however there was larger production of beta 1,3 during the invasion. The variation of the expression of such enzymes in different culture means suggests complexity of specific biochemical roles for your production raising new approaches for the recognition of the roads that they promote the development of the disease.

Introdução

1.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Dentre os fitopatógenos os fungos se caracterizam como sendo de grande complexidade e diversidade quando comparados como os demais patógenos microbianos. Os fungos podem interagir com uma grande gama de espécies vegetais bem como obedecer à alta especificidade e especialização patogênica. Os fungos de plantas são capazes de digerir a parede celular de plantas hospedeiras utilizando para tal uma série de mecanismos bioquímicos e morfogenéticos que otimizam a invasão. Desta forma o conhecimento dos mecanismos de invasão por parte dos fungos fitopatógenos é de grande importância na economia agrícola (BAKER *et al.*, 1997).

Segundo COSTA (1997), a incidência de doenças causadas por fungos, sobretudo os patógenos de solo como a *Sclerotinia sclerotiorum* é favorecida pelas temperaturas de 15 a 25 °C, bem como alta umidade e pH entre 4,5 – 5,0. Um dos principais fitopatógenos de solo é a *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Este fungo ataca aproximadamente 400 espécies de plantas entre monocotiledôneas e dicotiledôneas sendo estas últimas infectadas preferencialmente. O prejuízo econômico ocorre em uma grande variedade de cultivares (STEADMAN, 1994). Segundo WILLETTS & WONG (1980), as doenças causadas por *S. sclerotiorum* são mais comuns nas famílias *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Umbelliferae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae* e *Leguminosae*.

1.2. Distribuição geográfica

Devido a sua ampla capacidade de adaptação o mofo branco, doença causada por *S. Sclerotiorum*, é comum em vários países dos cinco continentes (PURDY, 1979). No Brasil, o primeiro registro de ocorrência do mofo branco foi em 1920 infectando a batata (*Solanum tuberosum*) no estado de São Paulo. Também na região do Rio Grande do sul foi constatado o ataque em cultura de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em 1954 (CHAVES, 1964). O mofo branco atacou as plantações de feijão do sul e sudeste brasileiro nas décadas de 40 e 50 sendo considerada um patógeno secundário, contudo em 1976 foi registrada a primeira epidemia severa de *S. sclerotiorum* em lavouras de soja, no estado do Paraná (região sul) que disseminou através de sementes infectadas para a região dos cerrados em meados de 1980. Deste período por 10 anos o mofo

branco esteve presente, por exemplo, em 50% das lavouras de feijão irrigadas. Em 2002, registros mostram que a *S. sclerotiorum* esteve presente em quase todas as áreas das lavouras de feijão levando em alguns casos até 100% de perda produtiva (LOBO Jr., 2002). Sob condições favoráveis o mofo branco ocorre a disseminação, por sementes contaminadas, a outras culturas. Assim, condições de cultivo de inverno, com temperatura moderada e umidade geralmente excessiva, favorecem a germinação dos escleródios do fungo e o desenvolvimento de epidemias (CARDOSO *et al.* 1997; NELSON,1998).

O mofo branco ou podridão da haste tem surgido como uma significativa causa de perdas na produção de vegetais nas regiões norte-central dos Estados Unidos (YANG *et al.* 1999; WRATHER *et al.* 2001), central e leste do Canadá, Argentina, Brasil, China, Índia, Itália, Paraguai (WRATHER *et al.* 2001a), dentre outros países (HAMBLETON *et al.*, 2002).

Além de ocorrer em áreas do mundo relativamente frias e úmidas *S. sclerotiorum* também ocorre em localidades consideradas geralmente quentes e secas. Quando a temperatura se aproxima do ponto de congelamento (0°C) ou quando a temperatura de mais de 32°C prevalece, *S. sclerotiorum* é muito menos ativa que em temperaturas entre esses extremos. *S. sclerotiorum* foi reportada em vários países localizados em todos os continentes. É provável que este fungo ocorra em algum lugar de quase todos os países do mundo (PURDY, 1979).

1.3. Epidemiologia

O processo de disseminação do fungo *S. sclerotiorum* varia de acordo com o tipo de fase do ciclo reprodutivo do qual se encontra. Este pode ser disseminado, à curta distância da fonte de inóculo, em torno de 100m, pelos ascósporos transportados por correntes de ar; à média distância, pelos implementos agrícolas, animais (pássaros, insetos) e pelo homem, pois estes ascósporos podem sobreviver até 12 dias no campo (ABAWI & GROGAN, 1975) e a longa distância, pela semente ou outro material propagativo infectado. Cada apotécio pode produzir de 2 a 30 milhões de esporos em um período de alguns dias (VENETE, 1998).

1.4. Processo de infecção

O processo de infecção das plantas hospedeiras susceptíveis pode ocorrer a partir do micélio originado da germinação eruptiva do escleródio no solo. O escleródio consiste de uma massa compacta de hifa hialina entrelaçada, (tecido pseudoparenquimatoso), envolvida por uma camada de células com pigmentos negros (JONES & WATSON, 1969). O escleródio apresenta estrutura dura e resistente, que consiste de uma porção interior colorida chamada de medula e, externamente um revestimento protetor negro chamado de casca. São estruturas formadoras um corpo de resistência duro que fica dormente por um bom período e depois germina sob condições favoráveis (PUTZKE & PUTZKE, 2004). A casca contém pigmentos de melanina os quais são altamente resistentes à degradação, enquanto a medula consiste de células ricas em glucanas e proteínas. A forma e o tamanho do escleródio dependem do hospedeiro ou das plantas infectadas onde eles são produzidos (NELSON, 1998).

Sob condições nutricionais e ambientais favoráveis, o escleródio pode germinar diretamente com um novo crescimento micelial, a chamada germinação micelogênica. Entretanto na limitação nutricional, o escleródio pode germinar com a produção de um corpo de frutificação sexual especializado, o apotécio, que libera numerosos esporos (VENETTE, 1998). Este tipo de germinação é denominada carpogêncica. Os sinais e sintomas do mofo branco são característicos nos cultivares e atacam, haste, folhas, vagem e raízes em regiões normalmente próximas do solo. Os tecidos afetados são cobertos pelo crescimento micelial branco cotonoso característico da doença. O micélio forma massas compactas claras que, com o amadurecimento tornam-se pretas formando estruturas duras de dimensões variáveis visíveis a olho nu o escleródio.

O desenvolvimento do corpo de frutificação a partir do escleródio é condicionado à umidade e a proximidade da superfície do solo (VENETTE, 1998). Apenas os escleródios que se encontram na superfície do solo e até 5 cm de profundidade são funcionais, pois as estipes dos apotécios raramente atingem mais do que 5 cm de altura. O início da doença a partir do micélio, originado da germinação eruptiva do escleródio, é raro, pois demanda o contato das hifas com os tecidos susceptíveis das inflorescências e vagens (CARDOSO *et al.* 1997). A formação do apotécio geralmente ocorre após um período de dormência do escleródio o qual, dependendo da região, pode estar resfriado ou congelado. Temperatura fria parece ser o fator predominante no “condicionamento” do escleródio que quando as condições do solo estão favoráveis (capacidade de umidade do campo acima de 50%, temperatura entre 15°C e 18°C) entre 10 – 14 dias o apotécio pode ser formado (VENETTE, 1998). Os escleródios são produzidos no tecido

hospedeiro e permanece dormente no solo (JONES & WATSON, 1969). Ademais, na ausência de hospedeiro suscetível, a persistência dos escleródios no solo pode atingir até oito anos (ADAMS & AYERS, 1979).

Relativamente pouco é conhecido sobre os eventos bioquímicos durante a germinação carpogênica. Por analogia com outras estruturas germinativas, pode-se esperar que materiais de reserva sejam metabolizados para fornecer compostos os quais são utilizados para síntese dos componentes do estipe e do apotécio (TOURNEAU, 1979).

1.5. Patogênese

A patogênese por *S. sclerotiorum*. é um fenômeno complexo. O sistema enzimático não parece ser muito diferente de outros fitopatógenos de solo similares, ou mesmo de microrganismos saprófagos. *S. sclerotiorum* como patógeno parece, entretanto, ser dependente de uma complexa combinação de fatores que podem dominar a planta hospedeira agindo rapidamente antes que o hospedeiro possa responder. Esses fatores incluem: apressórios para capacitar a penetração mecânica da cutícula do hospedeiro; formação de hifas de infecção organizadas e especializadas que são capazes de um rápido desenvolvimento intercelular abaixo da cutícula do hospedeiro e no córtex; secreção de enzimas pectolíticas apropriadas e ácido oxálico para degradar a lamela média das células hospedeiras; cátions quelantes inibidores de atividades enzimáticas; mudança do pH do tecido hospedeiro para um ambiente mais favorável para a ação enzimática e tóxico para as células hospedeiras, fazendo que estas células desenvolvam uma menor resposta à invasão e produção de enzimas degradativas capazes de hidrolisar a parede celular e os constituintes protoplasmático fornecendo um suprimento constante e abundante de nutrientes para o crescimento rápido e desenvolvimento da hifa de infecção (LUMSDEN, 1976).

Os primeiros sintomas que geralmente desenvolvem nas folhas ou hastes jovens são as lesões encharcadas, que podem aumentar e se tornar uma podridão aquosa e macia na maioria dos hospedeiros (PURDY, 1979). Posteriormente, nos tecidos infectados, aparece uma eflorescência formada por um micélio cottonoso, constituindo os sinais característicos da doença, que sugerem o nome comum de mofo branco. Em seguida, este sinal adquire, paulatinamente, coloração chocolate a amarronzada (CARDOSO et al. 1997). HEGEDUS & RIMMER em 2005, elaboraram um

interessante trabalho do processo de invasão e suas características. Segundo eles, o início da contaminação se dá pela liberação no dos ascósporos oriundos dos apotécios desenvolvidos a partir do escleródio no solo. Na maioria dos casos o processo de penetração se dá diretamente através da cutícula e não pelos estômatos. Ocorre a formação de uma vesícula subcutilar que liberam suas enzimas, as cutinases que acabam por digerir a parede subcutilar da epiderme.

1.5.1 O ácido oxálico e os seus papéis na patogenicidade.

O envolvimento do ácido oxálico na patogenicidade da *S. sclerotiorum* é bem conhecido (DUTTON, 1996; GODOY et. al, 1990), demonstraram que fungos deficientes na produção de ácido oxálico não se comportaram como patogênicos. O ácido oxálico parece promover o seqüestro de cálcio pela queda de pH formando cristais de oxalato, sobretudo na lamela média, despolimerizando suas cadeias o que leva a um comprometimento da integridade da parede (BATEMAN & BEE'S, 1965). Várias enzimas, como as endo e exo poligalacturonases, as pectinases e as glucanases apresentam maior atividade em ambiente ácido pela secreção do ácido oxálico. Em particular, o ácido oxálico eleva diretamente a atividade da poligalacturonase SSPG1 (endo PG) sobretudo em ambientes em que o pH cai menos que 3,8 (ROLLINS, 2001; COTTON et. al , 2003). A queda de pH pode também interromper a interação entre as proteínas inibidoras da poligalacturonase da planta hospedeira ficando sujeita a ação enzimática.

O ácido oxálico também interfere no mecanismo de fechamento estomático por dois mecanismos: A) estimulando o acúmulo do potássio e a hidrólise do amido nas células guarda essencial para a abertura; B) interrompendo o processo ABA dependente, além disso, o ácido oxálico suprime a formação das espécies reativas de oxigênio (E.R.O) bem como o peróxido de hidrogênio liberados pela planta como mecanismo de defesa (ROLLINS, 2001; COTTON et. al , 2003).

1.6 A atividade das enzimas hidrolíticas durante o processo de invasão

O ácido oxálico promove ambiente para a ação das enzimas sobre a parede celular da planta hospedeira, tanto na superfície da parede quanto na lamela média por sua ação quelante. A atividade das poligalacturonases (PG) é induzida pela pectina ou

monossacarídeos derivadas da pectina como o ácido galacturônico (ALGHISI & FAVARON, 1995). O exame do padrão da expressão gênica das PGs na infecção tem demonstrado que existe uma ação coordenada. Para as *S. sclerotiorum* bem como outros fungos patogênicos a interação com a superfície sólida induz os eventos da penetração como a formação do apressório e a expressão da poligalacturonase SSPG1 é induzida por interações entre superfícies hidrofóbicas como a polisterene, filme superficial de cera, e, possivelmente, a própria cutícula. BATEMAN, em 1964 estudou as relações planta-hospedeiro / fungo induzindo os mecanismos de resistência e defesa às PGs em hipocótilos de feijão infectados por *Rhizoctonia*. Proteínas estruturais como as extensinas são também vitais para a manutenção da integridade da parede celular. A protease ACP1 (acid protease) e a aspartil protease (ASPS) foram identificadas na *S. sclerotiorum*. A Asps é expressa nos estágios iniciais e podem funcionar em conjunto com o sspg1 para promover a invasão e o avanço das hifas .

1.7 A ação das poligalacturonases

Da interação planta microorganismos ocorre uma série de processos bioquímicos complexos de sinalização química e ação enzimática. Para que ocorra a invasão celular é necessário que o fungo consiga atravessar a parede celular. Para tal, o agente agressor produz uma série de enzimas que rompem as ligações dos constituintes da parede celular destruindo a parede e invadindo e parasitando a célula.

A pectina é um constituinte celular formado por ligações monoméricas do ácido galacturônico que promove à parede resistência e formação estrutural à planta. As pectinases são enzimas que degradam substâncias que contém pectina e são largamente usadas no processamento de frutas e vegetais (AGUILAR, 1986). As poligalacturonases (PGs) catalisam a hidrólise da ligação glicosídica α - 1-4. Elas são classificadas de acordo com a sua atividade metabólica em endopolygalcturonases e as exopolygalcturonases. As exopoligalacturonases atuam rompendo as ligações α -D 1-4 terminais da cadeia de ácido D- galacturônico, enquanto que a ação das endopoligalacturonases se dá ao acaso (REXOVÁ-BENKOVÁ, 1976; ROMBOUTS, 1980). Diversas isoformas das poligalacturonases são produzidas por *S. sclerotiorum*, tanto em cultura, quanto em planta, entretanto, seu número total e propriedades diferem extensivamente entre os isolados fúngicos (CRUICKSHANK, 1983; RIOU, 1992; MARCIANO, 1982). Sua ação é elevada pela acidificação do meio o que é devido em

parte ao ácido oxálico. As modificações que ocorrem após os processos de tradução (glicosilação) e secreção (proteolíticas) podem vir a explicar a multiplicidade de enzimas hidrolíticas secretadas por fungos filamentosos. Uma melhor compreensão do mecanismo de patogenicidade pode contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle da doença.

1.8 A ação das β -glucanases.

As beta glucanas são largamente encontradas na natureza, sendo as β (1,4) glucanas mais abundantes. Elas estão presentes em muitos organismos diferentes como algas, moluscos, bactérias, plantas superiores, fungos e alguns invertebrados (STONE & CLARKE, 1992). Algumas beta glucanas, como a paramilon e a pustulana tem estruturas simples constituindo de simples ligações numa cadeia não ramificada. Outros, como a glucana da cevada [β (1,3-1,4) glucana], laminarina, esquisofilana, espigluçana e a escleroglucana [β (1,3 -1,6)] são moléculas de estrutura mais complexa com uma diversidade de ligantes tanto em cadeias lineares quanto em cadeias ramificadas. (SEVIOUR et al, 1992; STONE & CLARKE, 1992; PISTON et al, 1993; SCHMID et al, 2001). Os mecanismos de biossíntese das beta glucanas não são totalmente esclarecidos (SEVIOUR et el, 1992; STONE & CLARKE,1992). Sua produção pode ocorrer tanto extracelularmente quanto no citoplasma. As beta glucanas estão presentes como um dos principais componentes da parede celular de fungos e auxiliam juntamente com outros componentes na força e rigidez da mesma.(DeNOBEL et al, 2001; SMITS et al, 2001; ADAMS, 2004).

As beta glucanas citoplasmáticas ou extracelulares provavelmente são requisitados para uma série de funções, funcionando como fonte de carbono o qual pode ser utilizado pelo fungo sob condições restritivas, segundo PISTON et al em 1993.

RUELI & JOSELEAU (1991) trabalhando com um fungo patogênico, *Phanerochaete chrysosporium*, verificou que as beta glucanas extracelulares produzidos por ele induziam as plantas à desidratação e degradação tecidual.

Em *Botrytis cinerea* as glucanas não só protegem o fungo das respostas reacionais do hospedeiro ao micoparasitismo, como também auxilia nos estágios iniciais da infecção introduzindo nas mesmas enzimas hidrolíticas (GIL – AD et al, 2001)

1.9 Modo de ação das beta glucanases em fungos

As beta glucanases tem sido sistematicamente classificadas pela Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) (IUB, 1992) pelo tipo de ligações que são hidrolizadas bem como o padrão de hidrólise sobre substratos específicos. Elas são distinguidas em dois grandes grupos de acordo com seus padrões de ação em exo e endo hidrolase. As exo hidrolases são conhecidas por clivar ligações cujos produtos correspondem à liberação de moléculas de glucanas. As endo hidrolases liberam oligossacarídeos durante a hidrólise (REESE, 1997; YAMAMOTO & NEWVINS, 1983). Dados de substratos específicos e estudos de inibição sugerem que as beta glucanases extracelulares de origem fúngica são melhor considerados como beta glucosidades (E.C.3.1.21) (RIDRUEJO et al, 1989). As glucanases podem ativar as ligações moleculares em diferentes estratégias de ataque

1.10 Propriedades da atividade das beta glucanases

Alguns estudos tem avaliado a propriedade das beta glucanases em fungos. CUTFIELD et al (1999) demonstraram em *Cândida albicans* que a exo β (1,3) glucanase, o esperado beta/alfa 8 estruturas “em barril” que contém um sítio ativo poderia explicar ambos as reações de transferência ou clivagem desta enzima.

Embora os fungos apresentem maior produção de β (1,3), β (1,6) e exo β (1,3) glucanases β (1,4) glucanases alguns poucos estudos sugerem a ocorrência da β (1,2) glucanase (REESE et al, 1962; CHESTERS & BULL, 1963; REESE, 1977; STONE & CHARKE, 1992; PITSON et al, 1997b). Elas são muito comuns mas com baixa atividade em relação às demais glucanases. CHEN et al em 1997 destacou o gene para β (1,3), (1,4) glucanases em um fungo anaeróbico o *Orpinomyces* PC-2. EM 2002, Moyna et al, estudaram a sequência do gene *ENGL1*, um gene que codifica para uma endo β (1,3) glucanase em *Aspergillus fumigatus* sugerindo que esta enzima pertença à nova família das glicosil – hidrolases.

1.11 Funções das beta glucanases

Segundo Moyna et al em 2002, as β (1,3) glucanases parecem ser onipresentes nos fungos. Muitas delas estão relacionadas à parede desenvolvendo importantes papéis

numa série de processos morfogênicos, sobretudo em fungos (ADAMS, 2004). O local onde age as beta glucanases são ainda desconhecidos e quase sempre a localização não corresponda necessariamente à função enzimática. Por exemplo, a exo (1,3) β glucanase em *Cândida albicans* é uma enzima extracelular mas a sua similar EXG1p de *Saccharomyces cerevisiae* tem ambas as atividades hidrolítica e de transferência sugerindo função no metabolismo da própria parede do fungo bem como atividade morfogenética em ambos (STUBBS et al 1999).

Evidências sugerem que a β (1,3) glucanase desempenha papel chave nos processos morfogênicos e morfológicos durante a diferenciação e desenvolvimento. (ADAMS, 2004), bem como a mobilização das beta glucanases em resposta às condições de déficit energético. (PITSON et al, 1993). As beta glucanases representam importante papel em rotas nutricionais na ação saprofítica e micoparasitária onde tais enzimas representam a arma primária na degradação da parede celular do fungo (STONE & CHARKE, 1992; PITSON et al, 1993; de la CRUZ et al, 1995b; AMEY et al, 2003).

Durante a biosíntese de parede celular ocorre um delicado balanço entre a hidrólise realizada na parede existente a formação da nova parede. As beta glucanas constituem o principal componente da parede celular dos fungos e parece que as beta glucanases desenvolvem importante papel neste processo possibilitando a inserção de material na formação da parede sem contudo ocorrer o rompimento total da mesma uma vez que a hidrólise ocorre em áreas localizadas.

A autólise do fungo é marcado por uma série de fatores e juntamente com outras hidrolases, as beta glucanases desempenham um importante papel. (WHITE et al, 2002). Em muitas espécies ocorre um aumento de atividade sob condições restritivas de carbono levando à autólise. É o que ocorre em *Botrytis* spp (STAHMANN et al, 1992), *Penicillium oxalium* (COPA – PATINO et al, 1989) e *Aspergillus nidulans* (NUERO et al, 1993)

1.12 Produção de beta glucanases

Em alguns fungos, as beta glucanases parecem ser constitutivas independente da fonte de carbono usada. Entretanto em outros pode haver aumento da produção destas enzimas pela presença de um substrato que não seja específico como, por exemplo, a quitina. A presença de um indutor molecular adequado e a ausência de glicose são

considerados essenciais para a produção das beta-glucanases na maioria dos fungos (PITSON et al, 1993). Isto evidencia que a produção das beta glucanases pode ter seus níveis aumentados por uma seleção cuidadosa da fonte de carbono disponível para o crescimento do fungo. Por outro lado, por exemplo, em *Trichoderma atroviride* o gene que codifica para a exo β (1,3) glucanase, *gluc78* foi expresso sob condições de restrição de nitrogênio e não na presença de substrato específico ou componente relativo como foi demonstrado por DONZELLI e HARMAN (2001). Isto sugere que possam existir outros fatores relacionados à síntese das beta-glucanases que não àquelas determinadas por fontes restritivas de carbono ou indução molecular.

2.0 Objetivos

S. sclerotiorum produz múltiplas enzimas hidrolíticas, conhecidas como fatores de patogenicidade, que promovem a degradação da parede celular da plantas. Porém pouco foi estabelecido a respeito de como e quais destas enzimas são importantes na patogênese ou qual seu papel específico durante o processo de infecção em diferentes culturas.

Baseado no seqüenciamento do transcriptoma de *S. sclerotiorum* durante a interação patogênica com plantas de feijoeiro, pôde-se verificar a presença de ESTs relacionadas a várias enzimas hidrolíticas. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo a determinação de algumas características bioquímicas e moleculares das poligalacturonases, β - 1,3 glucanase e β -1,4 glucanase produzidas por *S. sclerotiorum* durante a interação patogênica em plantas de feijão (interação parasitária) e sua comparação com o crescimento em condições saprofíticas.

2.1 Metas

1. Determinar a produção de poligalacturonases e β -1,3 e β -1,4 glucanases durante ambos os processos (interação parasitária e saprofítica), através de dosagem da atividade enzimática.
2. Avaliar comparativamente a expressão dos genes de poligalacturonases, β -1,3 e β -1,4 glucanases através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo.

3.0 Material e Método

3.1 Linhagem e condições de cultivo

Foi utilizado *S. sclerotiorum* (SPS) isolado e caracterizado no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília. A cultura foi preparada em placa de Petri contendo meio BDA - Batata-Dextrose-Agar (batata 250g; dextrose 20g; agar 15g; água destilada 1000 ml; pH 5.8) mantidas em estufa BOD a 20 °C.

3.2 Estabelecimento do processo de infecção:

O Isolado de *S. sclerotiorum* previamente caracterizado, crescido em meio BDA, foi utilizado para o inóculo de plântulas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), 15 dias após a emergência, segundo o método descrito por HUNTER *et al.* (1984). Foram utilizados 3 vasos por tratamento para cada hospedeiro (5 plantas por vaso). As plantas foram inoculadas pelo método do palito de dente e mantidas sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo.

Palitos de dentes de madeira de aproximadamente 1 cm da extremidade, foram autoclavados a 121°C por 30 minutos. Escleródios do isolado foram incubados concomitantemente com os palitos, por 5 dias em BOD a 20 °C. Sob estas condições, o micélio se desenvolveu junto aos palitos sendo estes inoculados nos caules das plantas.

Durante o período de 10 dias, descrito para o estabelecimento da infecção MIKLAS & GRAFTON (1992), foram retirados o micélio da região infectada (tecido da planta infectado) para extração de RNA e proteína total, seguindo os seguintes tempos: controle, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 10 dias de infecção.

3.3 Crescimento em meio com Pectina, Glicose e Extrato de parede

O Isolado de *S. sclerotiorum* foi inoculado em 50mL de meio mínimo (2g NH₄NO₃, 1g KH₂PO₄, 0,1 MgSO₄ 7H₂O; 0,5g extrato de levedura, 3g D ácido malico, 1g NaOH) suplementado com 1% de pectina (citrus pectin –SIGMA) ou 2% de glicose para as amostras controle. As culturas em Erlenmeyers de 250 mL foram mantidas a temperatura de 20°C, com agitação constante (120 rpm) por 10 dias.

Foram retiradas amostras nos períodos de: 2h, 24h, 48h, 72h, 96h e 10 dias. As amostras foram filtradas em tecido TNT autoclavado e reservadas a -20°C , para posterior estudo das respectivas atividades enzimáticas. A variação do pH do meio foi monitorada durante o crescimento nas respectivas condições.

3.4 Precipitação com sulfato de amônio.

O sobrenadante das culturas foi fracionado em solução saturada de sulfato de amônio 80%. Centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 min. a 4°C . O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0. A fim de retirar o excesso de sulfato de amônio, o material foi dialisado em membrana de celulose (MM 14.000 KDa) por 24 horas a 8°C com tampão fosfato de potássio 5mM, trocando-se o tampão por duas vezes. A fração dialisada foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min. E armazenada a -20°C antes do uso.

3.5 Determinação de proteínas totais:

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com BRADFORD (1976)

3.6 Atividade de Exopoligalacturonase.

A atividade das poligalacturonases foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de pectina, de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico – DNS (MILLER, 1959) A mistura de reação constou de 250 μL de solução de pectina cítrica 0,5% em tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 5,0, adicionada de 1 mM de EDTA mais 250 μL de extrato enzimático dialisado. Após completa homogeneização, os preparados foram incubados a 50°C ; decorrido 10 minutos, em cada tubo reação foi adicionado 0,5 mL de DNS, seguido de imediata agitação e incubação em água fervente, por cinco minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, o conteúdo de cada tubo de reação foi diluído com 5 mL de água destilada esterilizada e submetido novamente a agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 575 nm e os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de ácido monogalacturônico. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi

definida coma a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de acido monogalacturonico por minuto da reação, nas condições descritas. A atividade liberadora de açucares redutores foi expressa em $\mu\text{mol/mL}$.

3.7 Atividade da Beta 1,3 glucanase

A atividade das glucanases foram determinadas pela quantificação de açucares redutores no sobrenadante das culturas suplementado com: extrato de parede 1%, pectina 1% (citrus pectin –SIGMA) e 2% de glicose para as amostras controle, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A mistura da reação constituiu-se de 50 μL da amostra do sobrenadante em 50 μL de substrato laminarina em tampão de acetato de sódio 0,025mM, pH 5,0. As amostras foram incubadas a 50°C por uma hora em banho maria. Em seguida, adicionou-se 1mL de DNS e após homegeinização e agitação levou-se à água fervente por 5 minutos. Após o resfriamento com gelo o conteúdo de cada tubo foi diluído com 5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectofotômetro a 575 nm.

3.8 Atividade da Beta 1,4 glucanase

A atividade das glucanases foram determinadas pela quantificação de açúcares redutores no sobrenadante das culturas suplementado com: extrato de parede 1%, pectina 1% (citrus pectin –SIGMA) e 2% de glicose para as amostras controle, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A mistura da reação constituiu-se de 50 μL da amostra do sobrenadante em 50 μL de CMC (carboxi-metil-celulose- SIGMA) em tampão acetato de sódio 0,025mM, pH 4,7. As amostras foram incubadas a 50°C por uma hora em banho maria. Em seguida, adicionou-se 1mL de DNS e após homegeinização e agitação levou-se à água fervente por 5 minutos. Após o resfriamento com gelo o conteúdo de cada tubo foi diluído com 5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectofotômetro a 575 nm.

3.9. Análise da Expressão gênica

3.9.1 Extração de RNA total de *S. sclerotiorum*

As amostras coletadas nos diferentes tempos da interação *S. sclerotiorum*/planta, e crescimento em diferentes condições de cultura. Cerca de 180 mg de tecido (peso úmido) foram empregados para extração de RNA total. A essa massa de células foi adicionado 1mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen). A lise das células foi realizada por continuada agitação em “vortex” por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, a extração do RNA total foi realizada conforme especificado pelo fabricante do reagente Trizol[®] (Invitrogen). Centrifugou-se a amostra por 1 min a 10000 g (T.A.), transferindo-se o sobrenadante para novo tubo e descartando-se os debris sedimentados (repetiu-se esse procedimento). À amostra coletada adicionou-se 200 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (12.000 g / 15 min / 4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e, após 10 min de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (12.000 g / 10 min / 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (7500 g / 5 min / 4°C). Em seguida deixou-se o sedimento secando à temperatura ambiente e, posteriormente, o mesmo foi ressuspendido em 100 µl de água Milli Q.

Após quantificação por espectrofotometria e verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, em condições livre de RNase (Sambrook & Russel, 2001), cerca de 10 µg do RNA total obtido foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase (Promega) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 25 µL de reação, foram: Tampão da DNase I 1X; 10 Us da enzima DNase I livre de RNase (Promega). O tratamento foi realizado a 37° C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de EDTA 2,5 mM (concentração final) e aquecendo-se a 65° C por 10 minutos. Após precipitação padrão com etanol (Sambrook & Russel, 2001), o RNA total tratado com DNase I livre de RNase foi novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, sendo todos os procedimentos realizados em condições livres de RNase .

3.9.2. Desenho de Oligonucleotídeos para amplificação dos genes de interesse.

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para alguns genes de poligalacuronases e β -glucanases descritos no processo de infecção (Tabela 1). Foram também sintetizados oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento do gene 28S do rDNA, esse gene serviu como controle interno nos experimentos de RT-PCR semi-quantitativa realizados. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas seqüências obtidas pelo Projeto Transcriptoma de *S. sclerotiorum* (Li *et al.*, 2004), utilizando-se o *software Primer-3*, disponível *on-line* (<http://www-genome.wi.mit.edu>).

Tabela 1. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados .

<i>Genes</i>	Possíveis funções	Nº de acesso no <i>Gene Bank</i>	PRIMERS (5'-3')	Tamanho fragmento amplificado (pb)	TM (°C)
<i>PG1</i>	Endopoligalacturonase	L1202	-TCTGCAGCAGTCGAGAAGA-- GTGTTGTGTCCGAGGGAGTT-	495	60
<i>PG3</i>	Endopoligalacturonase	AY312510	-ACCCACCACTTTGGCTACTG- -TGAGACGGTAAGACCCTTGG-	448	60
<i>PG5</i>	Endopoligalacturonase	<u>CD646235</u>	-TGTCGAAGTTTTTCAGTATT- -CTACCAGCATTTCATTAT-	452	60
<i>PG6</i>	Endopoligalacturonase	CD645962	-AAGCTTATTGGAATGGGTAT- -CTGGAGTTGACGATTTGACTA	462	60
<i>PG7</i>	Endopoligalacturonase	CD645693	-TCCGGTTACGAGGATGTTA- -GCTCCTGGACACGTCATT-	380	60
1,4 <i>GLU</i>	- Endo β -1-4 glucanase	SS1G_00458	-CAAGGCAGCTTAACCGCTAC- -GATCCATCGGAGTCGAGGTA-	452	60
1,3 <i>GLU</i>	- Exo-1,3-beta-glucanase	SS1G_060371	-ACCCCGATACTGCTGTGTGC- -TGCCTCCATGAAATATGCAA-	404	60
rDNA	Ribossomal 28S	-	-GGTGGAGTGATTTGTCTG- -CTTACTAGGGATTCTCTG-	617	65

3.9.3 RT- PCR (Transcriptase Reversa):

Para a síntese do cDNA, 1 μ g de RNA total, sem DNA, foi colocado em microtubo de PCR e a este foram acrescentados 1 μ l de oligo (dT) (50 μ M) Invitrogen e 1 μ l de dNTP mix (10mM) (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP em pH neutro). Os volumes foram ajustados com água para 13 μ l. As amostras foram aquecidas a 65° C por 5 min e incubadas em gelo por 1 min. A transcrição reversa foi feita utilizando o kit da Invitrogen Super ScriptTM III Reverse Transcriptase. Em cada um dos tubos foram adicionados 6 μ l do mix contendo: 4 μ l do tampão First-Stand (5X); 1 μ l DTT (0,1 M); 1 μ l Super ScriptTM III RT (200 unidades/ μ l). As amostras foram incubadas a

temperatura ambiente por 5 min. A seguir, no termociclador, incubou-se a 50° C por 60 min; a reação foi inativada, aquecendo-a a 70° C por 15 min.

Para as reações em cadeia de polimerase utilizou-se o kit da Invitrogen Platinum *Taq* DNA polimerase. Para cada um dos tratamentos e para cada um dos pontos coletados foi observada a expressão gênica de cinco Poligalacturonases (*pg1*, *pg3*, *pg5*, *pg6* e *pg7*) e dos genes que codificam para a β -1,3 glucanase e β -1,4 glucanase, respectivamente. A PCR semi-quantitativa foi feita utilizando o fragmento amplificado para o rDNA 28S como controle interno da reação. Em cada microtubo de PCR uma alíquota correspondente a 1/5 da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em volume final de trinta (30) μ l contendo: 3 μ l do tampão *Taq* DNA polimerase (10X); 0,9 μ l Mg Cl₂ (50mM); 0,3 μ l DNTP (25 mM); 1 μ l sense primer e 1 μ l antisense primer dos respectivos genes analisados e 1 μ l sense primer e 1 μ l antisense primer para os oligos de controle interno; e 0,5 μ l da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/ μ l). No termociclador as amostras foram aquecidas a 95° C por dois minutos para a desnaturação; vinte e cinco ciclos de 92° C por um minuto e trinta segundos; 45° C por um minuto; 72° C por um minuto e trinta segundos; e uma extensão final de 72° C por cinco minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Para isso utilizou-se o tampão TBE e brometo de etídeo para visualização das bandas em luz UV.

3.9.4 Quantificação dos níveis de expressão gênica

A análise dos resultados obtidos visando à quantificação dos níveis de expressão do gene de interesse foi feita por densitometria, utilizando-se o programa “*Scion Image*”, disponível no endereço da internet <http://www.scioncorp.com>. Os níveis de expressão do gene rDNA 28S, constitutivo para *S. sclerotiorum*, permitiram a normatização dos resultados. A partir dos valores obtidos por densitometria, referentes a cada fragmento amplificado, foi determinada a razão entre o nível de expressão dos genes de poligalacturonases em relação à expressão do gene controle (rDNA 28S), para cada uma das condições (tratamento e controle) empregadas.

4.0 Resultados

4.1. Condição de manutenção e cultivo de *S. sclerotiorum*.

Em nosso trabalho estabelecemos condições que pudessem avaliar a atividade enzimática bem como a expressão gênica das poligalacturonases (*pg1*, *pg3*, *pg5*, *pg6* e *pg7*) e Beta glucanases (β - 1,3*glu* e β - 1,4*glu*) durante a interação fungo *S. sclerotiorum* e plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Para tal, foram realizadas condições ambientais que favoreceram o crescimento do fungo em casa de vegetação bem como a avaliação em laboratório das atividades enzimáticas e expressão gênica.

4.1.1 Estabelecimento do processo de infecção: *S.sclerotiorum* x feijoeiro.

Os feijoeiros após 20 dias de emergência do solo foram inoculados com pontas de palito de dente, autoclavadas e colonizadas com micélio de *S. sclerotiorum* crescido por 5 dias em estufa a 20°C (Figura 1). As plantas foram mantidas em condição de casa de vegetação por um período de 10 dias. A coleta do material foi feita nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção pelo fungo cortando-se apenas a região afetada (Figura 2).

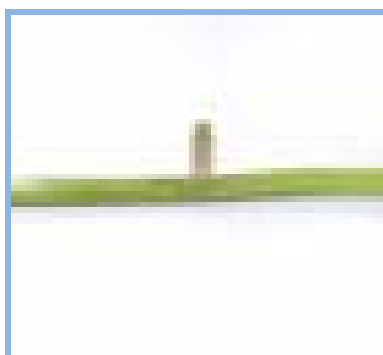


Figura 1 - Método do palito de dente. Ponta de palito de dente colonizada com micélio de fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, crescido por 7 dias, aplicado no caule do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)



Figura 2 - Caule de feijão infectado por *Sclerotinia sclerotiorum*. A evolução da infecção é demonstrada para os pontos 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação.

O material coletado apresentou uma evidente evolução da infecção (Figura 2). Nas primeiras 24 horas após a inoculação, observou-se que a região no caule em torno do palito tornou-se escurecida. Nas próximas 48 horas esse escurecimento se alastrou por uma área maior e tornou-se perceptível a presença de pequena quantidade de micélio aéreo. Em 72 e 96 horas após inoculação o micélio se torna evidente tomando grande parte do caule e escurecendo toda região afetada. A área escurecida observada durante o período de infecção pode ser devido à ação das poligalacturonases e outras enzimas hidrolíticas liberadas pelo fungo, as quais causam maceração do tecido da planta provocando a perda de integridade de tecido.

4.1.2 Crescimento de *S. sclerotiorum* em meio Mínimo

Para propiciar a avaliação do fungo em condições saprofíticas, *S. sclerotiorum* foi inoculado em meio mínimo nos tratamentos: pectina (1%), extrato de parede celular de plantas de feijoeiro (1%) e glicose (2%). O fungo foi mantido em incubadora sob agitação de 120 rpm e temperatura de 20°C e após o período determinado de 12, 24, 48, 72, 96 e 240 horas a cultura foi filtrada em tecido TNT autoclavado para separar o micélio do meio, os quais foram estocados em - 20 °C.

O micélio coletado apresentou crescimento durante a indução com conseguinte redução do volume do meio de cultura em comparação com o adicionado no início do experimento. Após 72 horas de inoculação já era observada a formação de micélio aéreo recobrando a superfície do líquido e parte da parede do frasco. Com 240 horas de incubação ocorria a presença de escleródios o que é característico de queda na concentração de nutrientes e acidificação do meio.

4.1.3 Monitoramento do pH do meio de cultura

O pH do meio, sobrenadante obtido em cada coleta dos tratamentos, foi aferido através de pHmetro, seus valores estão dispostos na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Os valores de pH obtidos durante a indução com pectina indicam uma queda do pH a valores de 3,68 nas amostras de 24 horas para 2,76 com 48 horas após a inoculação, com conseguinte elevação para valores de 4,81 no ponto de 240 horas (10 dias). Padrão semelhante foi observado para o experimento de indução com parede celular de feijoeiro, em que houve uma discreta redução do pH com 48 horas de indução, seguido de uma elevação destes valores para 5,63 no décimo dia de indução. O experimento em meio contendo glicose foi utilizado como controle no processo de indução, uma vez que a glicose funciona como um repressor metabólico. Neste experimento, também foi observada uma discreta redução no pH da cultura, entretanto, isto ocorreu somente com 72 horas após a inoculação.

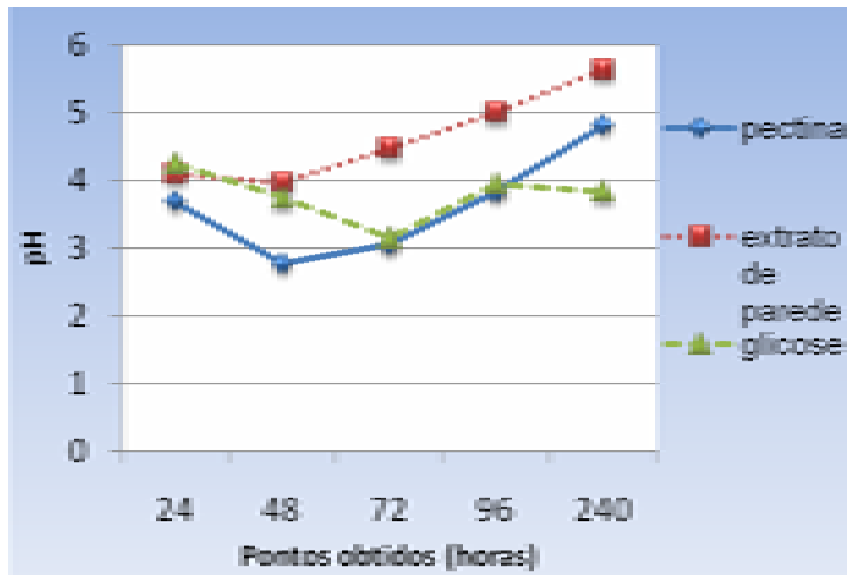


Figura 2 - pH do sobrenadante de cultura durante o cultivo de *S. sclerotiorum* sob diferentes fontes de carbono. A indução foi feita em meio mínimo contendo: 1% pectina; 2% glicose, 1% extrato de parede celular de feijoeiro. Tempo de cultivo: 0, 24, 48, 72, 96 e 240 horas.

4.2 Dosagem da atividade enzimática

4.2.1 Determinação de proteína total

Para estabelecer o perfil de proteínas totais presentes no sobrenadante de cultura de *S. sclerotiorum* frente aos diferentes tratamentos de indução, as amostras obtidas como descrito anteriormente foram concentradas através de liofilização e a quantidade total de proteínas foi dosada pelo método BRADFORD (1976) demonstrada no gráfico a seguir (Figura 4).

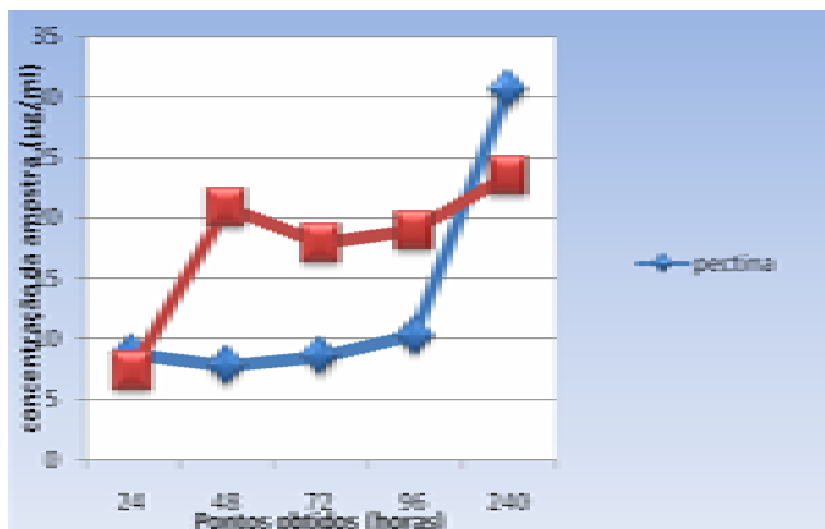


Figura 4 – Concentração de proteína total das amostras obtida com o método de Bradford. As amostras foram concentradas por liofilização e o teor de proteínas totais foi aferido pelo método Bradford (1976).

Foi observado aumento da concentração de proteínas totais ao longo do período de indução. Este resultado é o esperado devido ao acúmulo de proteínas secretadas durante o período de crescimento do fungo.

4.2.2 Atividade das poligalacturonases

A atividade enzimática das poligalacturonases foi obtida através da redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) pelos açúcares redutores liberados pela solução de pectina encubada com o sobrenadante de cultura (amostras). A leitura dos dados foi feita em espectrofotômetro a 575nm.

Para o tratamento com extrato de parede houve um leve aumento da atividade enzimática até o ponto de 72 horas com seguinte queda (Figura 5). O pico da atividade enzimática das poligalacturonases em meio contendo 1% de pectina aconteceu com 48 horas de incubação. A atividade das PGs em meio contendo 2% glicose permaneceu em um nível basal. A leitura do pH obtido do sobrenadante de cultura com pectina indica uma queda expressiva nos primeiros dias de incubação com conseguinte elevação da mesma.

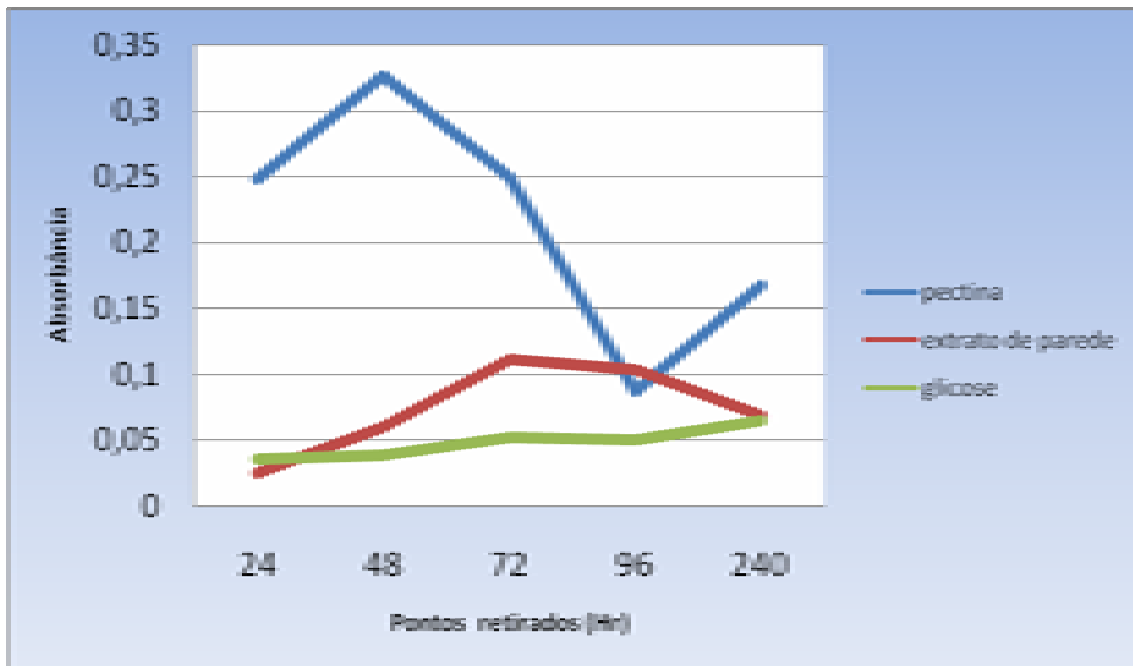


Figura 5 - Atividade de poligalacturonases secretadas por *S. sclerotiorum* em diferentes condições de cultivo. A atividade das poligalacturonases foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de pectina, de acordo com o método DNS (MILLER, 1959). Meio contendo: 1% pectina, 2% glicose ou 1% de extrato de parede celular de feijoeiro. Tempo de cultivo: 24, 48, 72, 96h e 10 dias, respectivamente.

4.3 Atividade das beta glucanases

4.3.1 Atividade da Beta 1,3 glucanase

A atividade das glucanases foram determinadas pela quantificação de açúcares redutores no sobrenadante das culturas suplementado com: extrato de parede 1%, pectina 1% (citrus pectin –SIGMA) e 2% de glicose para as amostras controle, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Como descrito anteriormente, o substrato utilizado na reação para a β -1,3 glucanase foi a laminaria em tampão acetato de sódio 0,025 e pH 5,0.



Figura 6 - Atividade de beta 1,3 glucanases secretadas por *S. sclerotiorum* em sob condições de cultivo com pectina. A atividade das beta 1,3 glucanases foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de laminarina, de acordo com o método DNS (MILLER, 1959). Meio contendo: 1% pectina. Tempo de cultivo: 12, 24, 48, 72, e 96h respectivamente.

Observa-se na figura 6 a produção de beta 1,3 glucanase a partir das 12 primeiras horas e uma discreta diminuição de sua atividade após 24 horas de indução. Ocorreu um aumento progressivamente da atividade em 48 horas com declínio abrupto em 72 horas e um acentuado aumento em 96 horas.

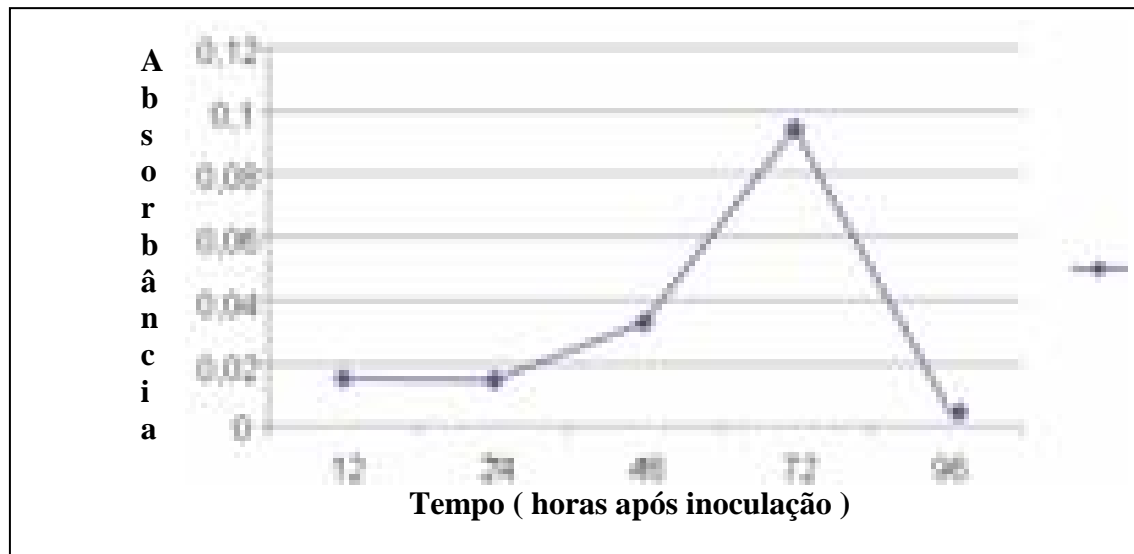


Figura 7- Atividade de beta 1,3 glucanases secretadas por *S. sclerotiorum* em sob condições de cultivo com extrato de parede a 1%. A atividade das beta 1,3 glucanases foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de laminarina, de acordo com o método DNS (MILLER, 1959). Meio contendo: Extrato de parede a 1%. Tempo de cultivo: 12, 24, 48, 72, e 96h respectivamente.

Em relação a indução com extrato de parede celular de feijoeiro houve produção da beta 1,3 glucanase secretada por *Sclerotinia* a partir das 12 horas não havendo aumento significativo em 24 horas. Em 48 horas ocorre aumento de quase o dobro da atividade, chegando no pico máximo em 72 com queda abrupta em 96 horas (Figura7).

4.3.2 Atividade da Beta 1,4 glucanase

Como descrito anteriormente a atividade das glucanases foram determinadas pela quantificação de açúcares redutores no sobrenadante das culturas suplementado com: extrato de parede celular de plantas de feijoeiro 1%, pectina 1% (citrus pectin –SIGMA) e 2% de glicose para as amostras controle, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A mistura da reação constituiu-se de 50 µL da amostra do sobrenadante em 50 µ L de CMC (carboxi-metil-celulose- SIGMA) em tampão acetato de sódio 0,025mM, pH 4,7.

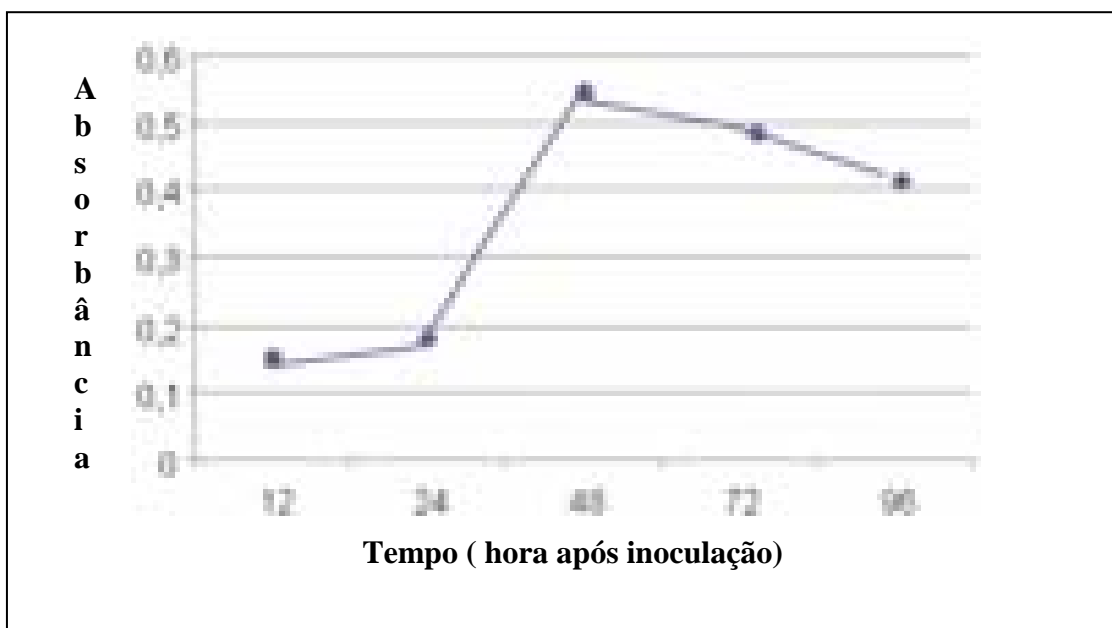


Figura 8 - Atividade de beta 1,4 glucanases secretadas por *S. sclerotiorum* em sob condições de cultivo com pectina a 1%. A atividade das beta 1,4 glucanases foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de CMC, de acordo com o método DNS (MILLER, 1959). Meio contendo: Pectina a 1%. Tempo de cultivo: 12, 24, 48, 72, e 96h respectivamente.

A curva representada na figura 8 mostra o perfil de atividade da Beta 1,4 glucanase em cultivo induzido com pectina a 1%. A atividade da Beta 1,4 glucanase foi aumentando progressivamente de 12 horas até as 24 primeiras horas e indução, obtendo pico máximo de atividade em 48 horas. A partir deste tempo ocorre diminuição progressiva em 72 e finalmente em 96 horas.

Semelhante o que ocorreu com a indução com pectina a Beta 1,4 glucanase em condições de cultivo induzido com extrato de parede a 1% , foi produzida em concentrações relativamente semelhantes das 12 até as 24 horas após a indução. Progressivamente houve aumento da atividade em 48 horas e apresentou o pico máximo em 72 horas decaindo nas próximas 96 horas (Figura 9)

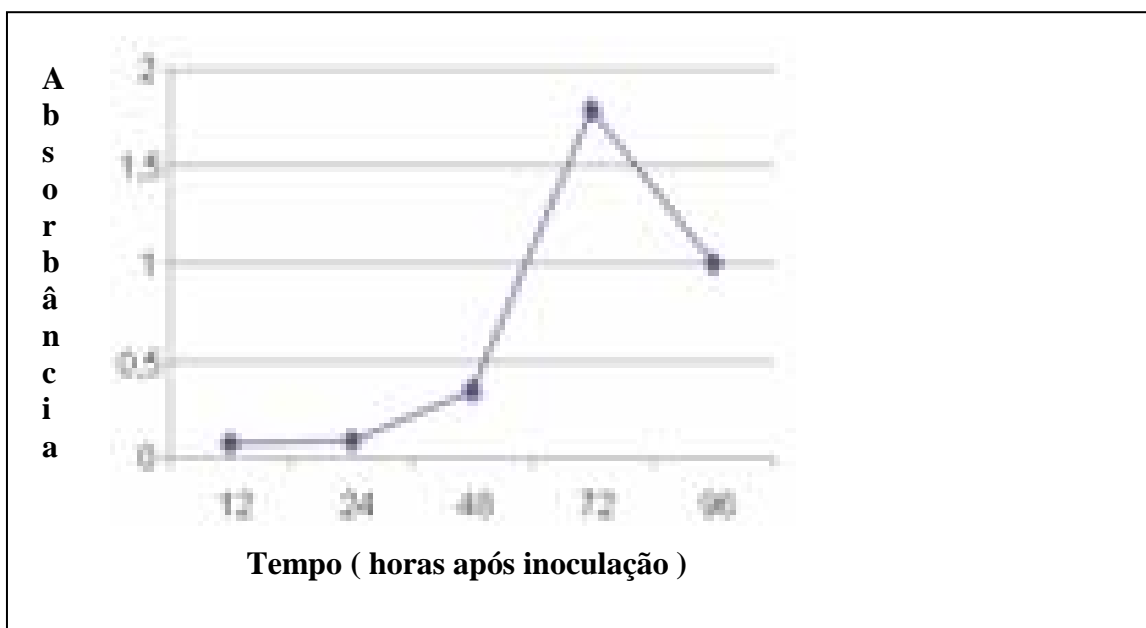


Figura 9 - Atividade de beta 1,4 glucanases secretadas por *S. sclerotiorum* em sob condições de cultivo com extrato de parede a 1%. A atividade das beta 1,4 glucanases foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de CMC, de acordo com o método DNS (MILLER, 1959). Meio contendo: Extrato de parede a 1%. Tempo de cultivo: 12, 24, 48, 72, e 96h respectivamente.

4.4 Análise da expressão gênica

4.4.1 Extração de RNA total

Para traçar o perfil de expressão gênica foi extraído o RNA total sob condições livres de RNAase e um gel de agarose foi obtido como confirmação da qualidade do RNA no tempo transcorrido de 24 a 96 horas (figura 10).

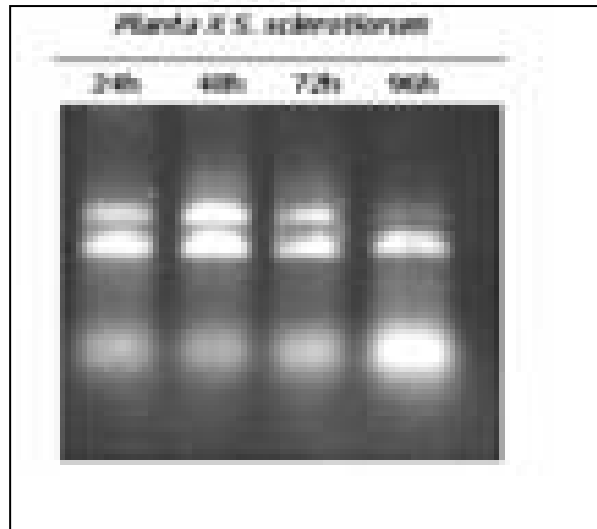


Figura 10 - Perfil eletroforético do RNA total extraído do fungo *S. sclerotiorum* na interação com plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Uma alíquota correspondente a aproximadamente 1 µg de RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, em condições livres de RNase. Poços 1-4: RNA total de *S. sclerotiorum* em interação com feijoeiro por 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação, respectivamente.

4.4.2 Processo de infecção plantas de feijoeiro com *S. sclerotiorum*.

Para verificar os níveis de expressão dos genes de interesse durante o processo de infecção das plantas de feijoeiro pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, foi sintetizado o cDNA a partir de 1µg de RNA extraído de tecido infectado. Como observado na figura 11, as amostras foram retiradas em 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5µL), foi empregada como molde para amplificação de um fragmento do gene de interesse: *pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β- 1,3 glucanase e β- 1,4 glucanase, respectivamente. 15µL da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

Após realizar o perfil eletroforético, determinou-se a densitometria das bandas através de um recurso computacional que determina o grau de resolução das bandas no gel. O programa (Scion image for Windows © scion corporation) permite que se identifique a área correspondente à banda no gel e a quantidade de pixels que a imagem da banda determina. Assim, pela quantidade de pixels verifica-se a expressão. A área de cada banda expressa pelo gene, foi obtida pelo programa. Determinou-se a densidade destas bandas, fez-se a diferença das áreas da banda do gene em questão, e o RNA ribossômico constitutivo. A partir da diferença das densidades encontradas e foi elaborado gráfico que caracterizam a expressão dos genes no tempo considerado.

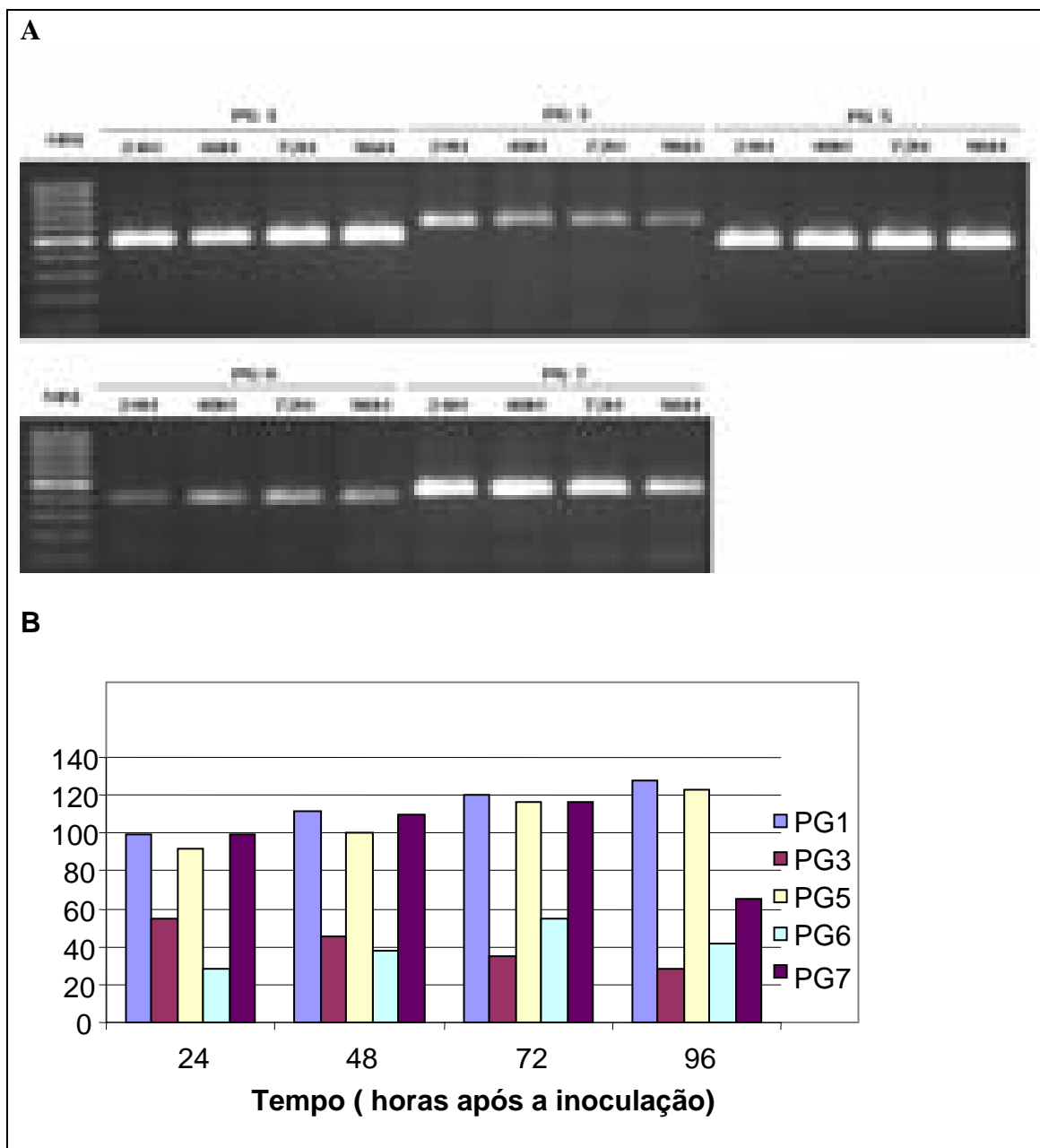


Figura 11- Análise da expressão de genes de poligalacturonase (PG), β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase de *S. sclerotiorum* durante a interação com plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **A-** A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 μ g de RNA do fungo obtido de plantas infectadas com *S. sclerotiorum*. As amostras foram retiradas com 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação de um fragmento do gene de interesse: *pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β - 1,3 glucanase e β - 1,4 glucanase, respectivamente. 15 μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. MM: marcador molecular 1Kb (Promega). **B-** Gráfico demonstrativo, por densitometria, da expressão dos genes de poligalacturonase (PG) *pg7*, *pg6*, *pg5*, *pg3* e *pg1* em *S. sclerotiorum* por RT-PCR. A expressão em porcentagem (%) foi determinada através da análise da densitometria. A densidade das bandas dos genes de PG e do rDNA constitutivo foram determinadas pelo programa específico (Scion Image®). A diferença entre a densidade das bandas caracteriza a expressão no tempo determinado.

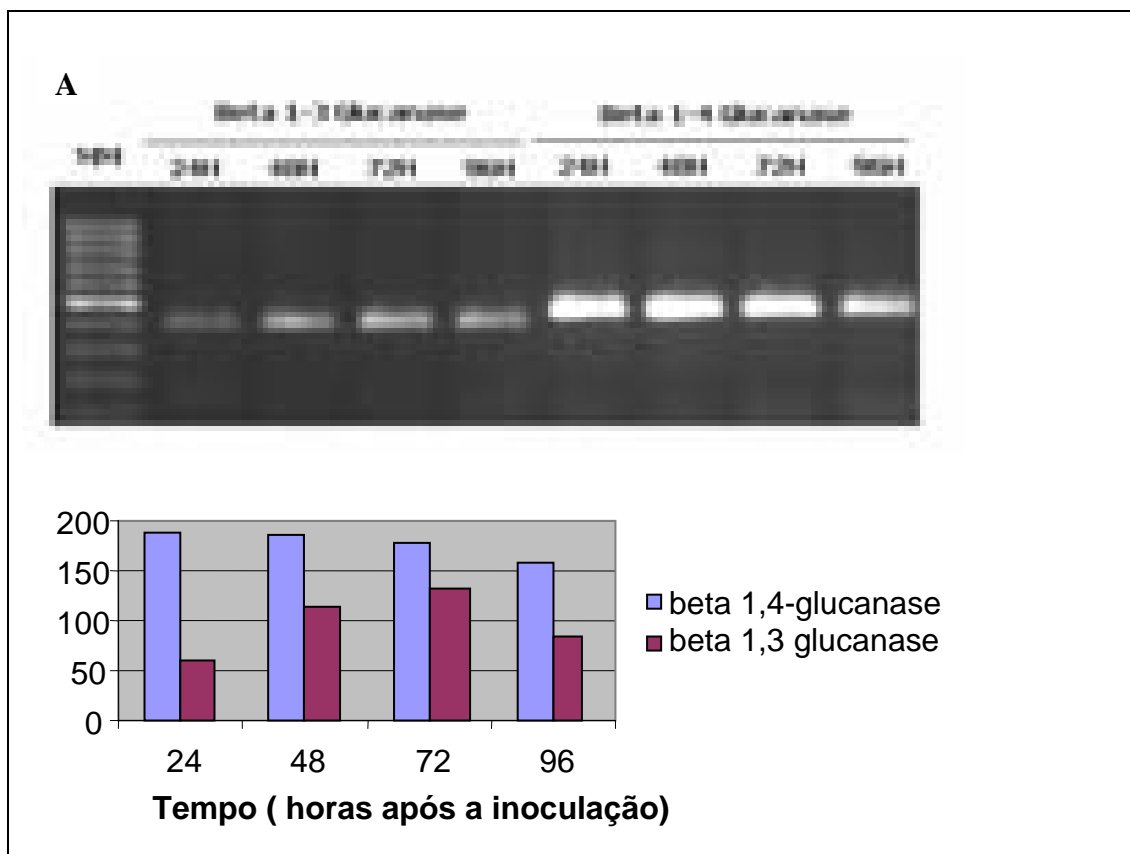


Figura 12- Análise da expressão de genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase de *S. sclerotiorum* durante a interação com plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A- A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 μ g de RNA do fungo obtido de plantas infectadas com *S. sclerotiorum*. As amostras foram retiradas com 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação de um fragmento do gene de interesse: *pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β - 1,3 glucanase e β - 1,4 glucanase, respectivamente. 15 μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. MM: marcador molecular 1Kb (Promega). B- Gráfico demonstrativo, por densitometria, da expressão dos genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase em *S. sclerotiorum* por RT - PCR. A expressão em porcentagem (%) foi determinada através da análise da densitometria. A densidade das bandas dos genes de PG e do rDNA constitutivo foram determinadas pelo programa específico (Scion Image ®). A diferença entre a densidade das bandas caracteriza a expressão no tempo determinado.

Pelos resultados obtidos observa-se claramente a expressão das poligalacturonases (PGs) durante a interação com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Pelo o que é visto na figura 11 ocorre a expressão do gene *pg 1* desde do início da infecção às 24 horas mantendo sua expressão aumentando levemente nas 96 horas seguidas. Da mesma maneira, a *pg 5* mantém sua expressão durante todo o período determinado obedecendo a uma uniformidade em sua expressão com acréscimo significativo em 72 horas. Quanto ao gene *pg7*, muito embora apresentam aumento

progressivo de sua expressão a partir das 24 horas percebe-se declínio da atividade após às 72 horas havendo queda significativa em 96 horas. Dois genes desta família, *pg 3* e *pg 6*, apresentaram menor expressão. A expressão do *pg 3* foi significativa nas primeiras 24 horas decaindo progressivamente até 96 horas. Já o gene *pg 6* inicialmente teve pouca expressão, porém com um aumento gradativo e pico em 72 horas, e, em 96 horas, observa-se queda em sua expressão.

Na figura 12 observa-se evidente diferença na expressão da beta 1-4 glucanase em relação à beta 1-3 glucanase. A primeira tem forte expressão em 24 horas diminuindo gradativamente até 96 horas. Pela análise do perfil eletroforético das beta 1-3 glucanase, observa-se fraca expressão em relação à referente beta 1-4. Entretanto, ocorre aumento progressivo e significativo da mesma a partir de 48 horas com pico máximo em 72 caindo sua expressão nas 96 horas seguintes.

4.4.3 Indução com diferentes fontes de carbono

Durante o crescimento de *S. sclerotiorum* em meio mínimo com pectina a 1 % ou extrato de parede celular de feijoeiro a 1% foi determinado os níveis de expressão para os genes de poligalacturonase (*pg1*, *pg3*, *pg5*, *pg6* e *pg7*), bem como os genes que codificam para a β -1,3 glucanase e β -1,4 glucanase, respectivamente.

4.4.3.1 Pectina

A RT-PCR foi feita a partir do mRNA de *S. sclerotiorum* cultivado em meio mínimo suplementado com 1% de pectina por 12, 24, 48, 72 e 96 horas o que é observado nos poços de 1 a 5 da figura 13. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (*pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β -1,3 glucanase e β -1,4 glucanase, respectivamente) e o gene constitutivo rDNA 28S. 15 μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (Figura 13).

Pela análise densitométrica da expressão gênica observou-se uma diminuição da expressão do gene *pg1* no tempo transcorrido. Houve expressão progressiva do gene *pg3* a partir das 12 horas com diminuição expressiva a partir das 72 horas finalizando com pouca ou nenhuma expressão em 96 horas. A expressão do gene *pg5* se manteve relativamente igual a partir das 12 horas havendo mínima expressão em 96 horas transcorridas. Semelhante ao gene *pg5* o gene *pg6* também manteve sua expressão no

tempo transcorrido com queda em 96 horas. O gene *pg7* apresenta expressão progressiva a partir de 12 horas aumentando gradativamente e diminuindo em 72 horas, elevando sutilmente sua expressão em 96 horas.

A expressão para o gene beta 1,3 glucanase nos tempos observados permaneceu constante bem como a expressão do gene que codifica para a beta 1,4 glucanase, porém nesta última não houve expressão nas 96 horas de indução (figura 14). A análise de densitometria dos transcritos para os genes de poligalacturonases analisados revelou que em todos os tempos analisados (12, 24, 48,72 e 96 horas) o gene *pg1* manteve sua expressão seguida do gene *pg6* sendo este ultimo pouco expresso em 96 horas, abaixo dos 20%. Em seguida o gene *pg6* manteve sua expressão em torno dos 40% até 72 horas diminuindo, contudo, em 96 horas. O gene para a PG3 foi expresso progressivamente a partir das 12 horas tendo pico máximo nas 48 horas e diminuindo gradativamente até manter-se em torno de 20% em 72 horas e abaixo desse valor nas 96 horas transcorridas. O gene *pg7* acompanhou proporcionalmente o gene *pg3*, porém tem sua expressão elevada nas 96 horas.

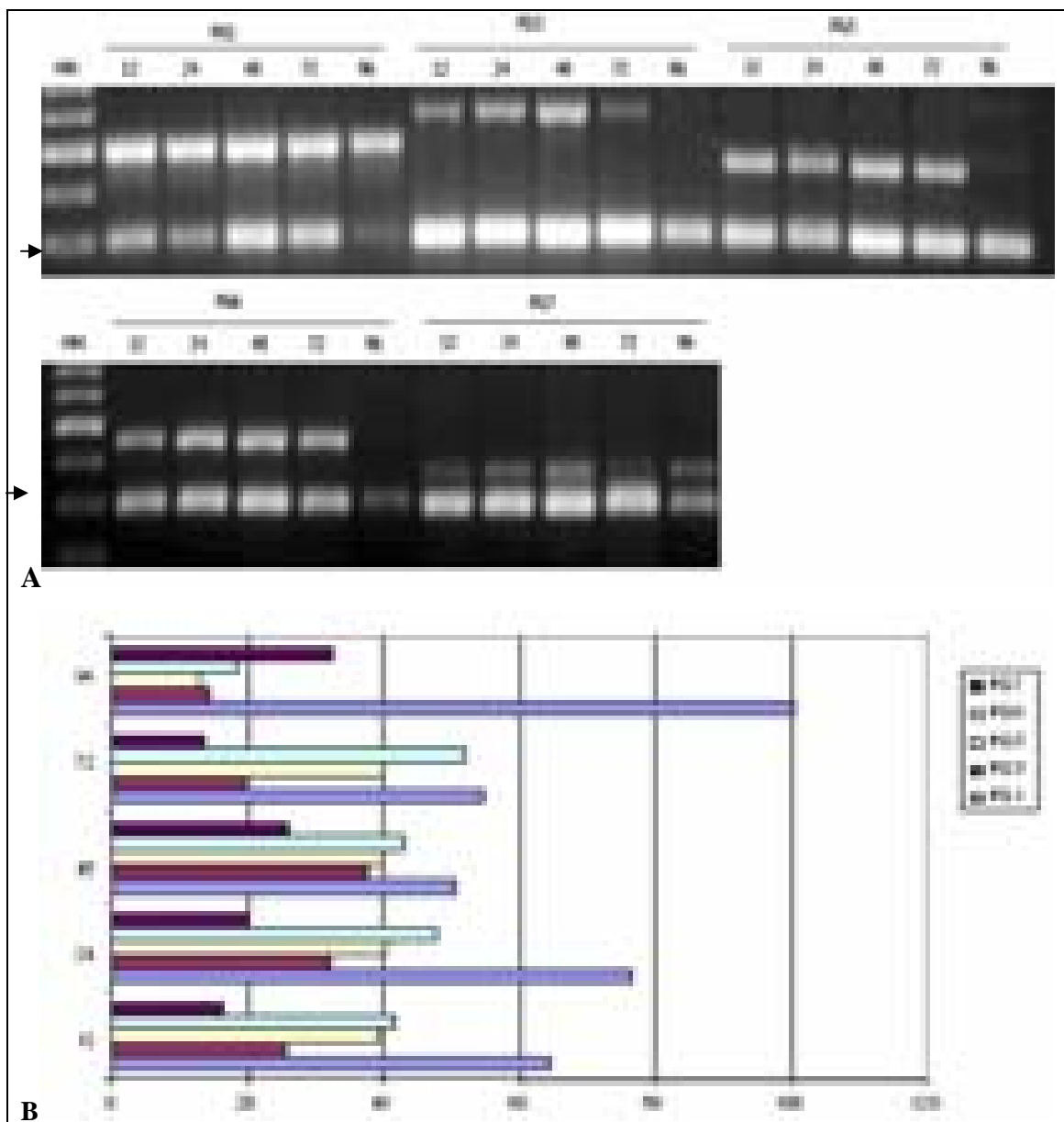


Figura 13- Análise da expressão de genes de poligalacturonase (PG), de *S. sclerotiorum* durante o crescimento em meio de cultura contendo 1% de pectina. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1µg de RNA do fungo obtido da cultura de *S. sclerotiorum*. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5µL), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (*PG1*; *PG3*; *PG5*; *PG6*; *PG7*, β- 1,3 glucanase e β- 1,4 glucanase, respectivamente) e o gene constitutivo rDNA 28S (seta). 15µL da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Poços 1 e 5: RT-PCR feita a partir do mRNA de *S. sclerotiorum* cultivado em Meio mínimo suplementado com 1% de pectina (Sigma) por 12, 24, 48, 72 e 96 horas. MM: Marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder (Promega). **B**- Gráfico demonstrativo, por densitometria, da expressão dos genes de poligalacturonase (PG) *pg7*, *pg6*, *pg5*, *pg3* e *pg1* em *S. sclerotiorum* durante o crescimento em meio de cultura contendo 1% de pectina. A expressão em porcentagem (%) foi determinada através da análise da densitometria. A densidade das bandas dos genes de PG e do rDNA constitutivo foram determinadas pelo programa específico (Scion Image ®). A diferença entre a densidade das bandas caracteriza a expressão no tempo determinado.

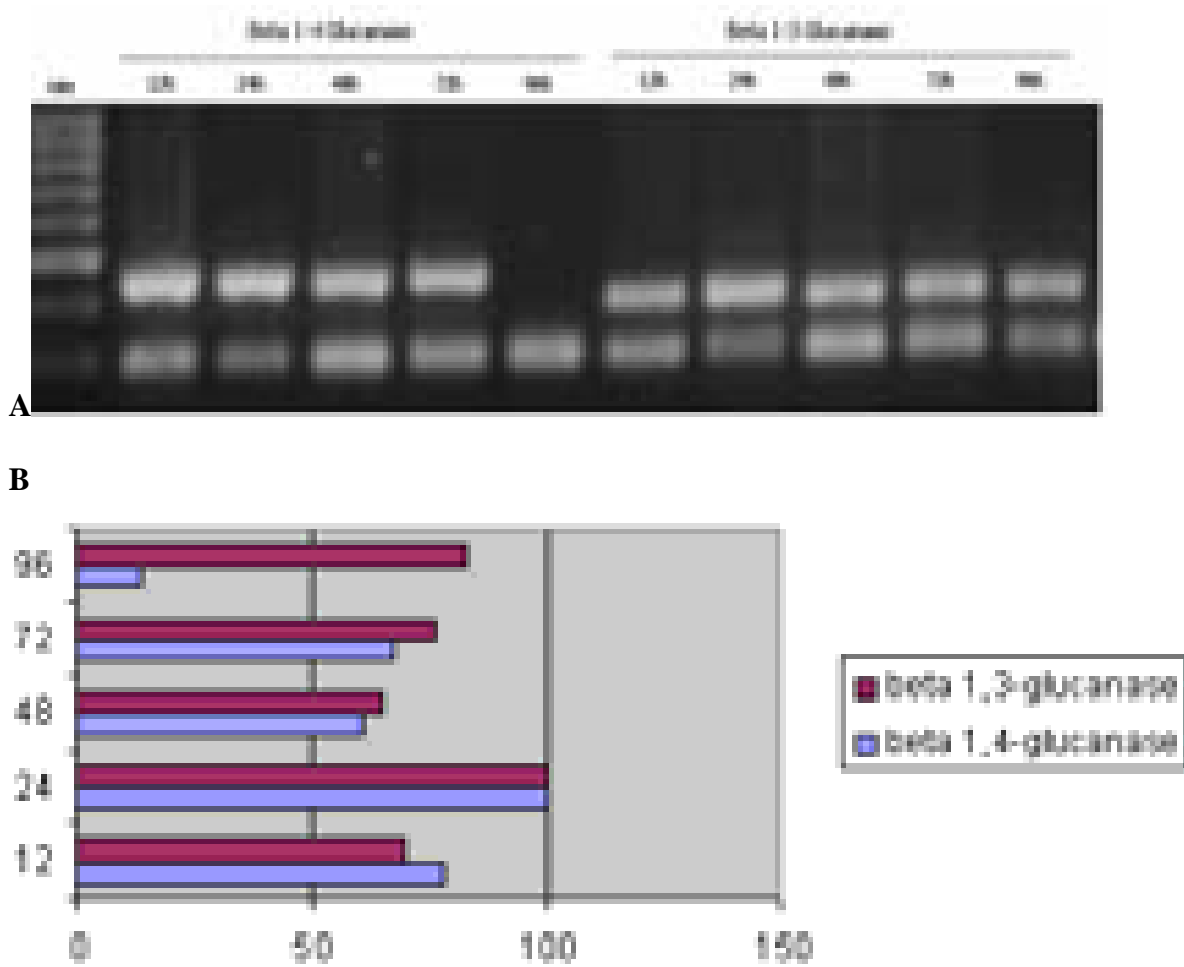


Figura 14- Análise da expressão de genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase de *S. sclerotiorum* durante o crescimento em cultura contendo pectina a 1%. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 μ g de RNA do fungo obtido de plantas infectadas com *S. sclerotiorum*. As amostras foram retiradas com 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação de um fragmento do gene de interesse: *pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β - 1,3 glucanase e β - 1,4 glucanase, respectivamente. 15 μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. MM: marcador molecular 1Kb (Promega). **B- glucanase em *S. sclerotiorum* por RT -PCR A expressão em porcentagem (%) foi determinada através da análise da densitometria. A densidade das bandas dos genes de PG e do rDNA constitutivo foram determinadas pelo programa específico (Scion Image ®). A diferença entre a densidade das bandas caracteriza a expressão no tempo determinado.**

A mesma análise de densitometria foi realizada para os transcritos dos genes beta 1,3 e beta 1,4 glunases (Figura 14). Verificou-se que o a expressão do gene beta 1,3 foi progressiva e tem sua expressão aumentada. O pico máximo de expressão foi conseguido em 24 horas, diminuindo nas 48 horas seguintes e aumentando acima dos

50% após este tempo. Em 96 horas a expressão aumentou mantendo a expressão próxima dos mesmos 50% . A expressão da beta 1-4, glucanase foi maior que a beta 1,3 glucanase nas primeiras 12 horas de indução. Em 24 horas a expressão de ambas foi semelhante. A expressão do gene beta 1,4 glucanase foi relativamente diminuída porem mantendo a proporção em relação ao gene beta 1,3 glucanase nas 48 e 72 horas sendo que em 96 horas a expressão foi drasticamente diminuída quando comparada com a expressão dos demais tempos.

4.4.3.2 Parede celular de feijoeiro

Além da pectina, foi utilizado extrato de parede celular (macerado de caule de plantas de feijoeiro) a 1% onde se verificou a expressão gênica sob esta condição, por 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Da mesma maneira que a indução com pectina, uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (*pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β - 1,3 glucanase e β - 1,4 glucanase, respectivamente) e o gene constitutivo rDNA 28S. 15 μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

Sob condições diferentes de fonte de carbono, também houve considerável diferença nos resultados encontrados no perfil de expressão para os genes de interesse analisados quando comparados aos perfis eletroforéticos dos mesmos quando da indução com pectina. Como pode ser observado na figura 15, houve expressão dos genes de *pg1* nas primeiras 12 horas, havendo mínima expressão em 24 horas com notável diferença. Esta expressão aumentou em 48 horas, diminuindo em 72 horas. Há relativa expressão do gene *pg1* em 96 horas quando comparada ao tempo precedente. O gene *pg3* , apresenta pouca expressão em 12 horas, caindo em 24 horas com pouca e/ou nenhuma expressão neste tempo. Há expressão em 48 horas, diminuição em 72 horas com aumento sutil em 96 horas. Quanto à expressão do *pg5*, não houve demonstração considerável da expressão no tempo determinado a exceção das 48 horas onde se observa tênue expressão quando comparada aos demais tempos. Em 12 horas ocorre ligeira expressão de *pg6*, contudo nas 24 horas seguintes a mesma não é observada. Ao contrário em 48 horas, percebe-se a o aumento da expressão progressiva, porém sem muita evidência, de 72 até 96 horas. Semelhante ao que ocorreu com o gene *pg5* o gene

pg7 teve sua expressão pouco evidenciada nestas condições de trabalho, sobretudo em 24 horas, muito embora se perceba fraca expressão em 48 horas.

Quanto a análise dos genes que codificam para as beta glucanses (1,3 e 1,4 respectivamente) em cultivo de extrato de parede a 1% observou-se expressão de ambos. Em 12 horas de indução houve a expressão do gene beta 1,3 glucanase que se manteve, muito embora diminuída em 24 horas. Um aumento progressivo foi observado em 48 horas e bastante evidência de sua expressão em 72 horas. Em 96 horas ocorre sutil diminuição quando comparada ao tempo anterior. O gene beta 1,4 glucanase foi expresso nas condições consideradas. Houve expressão em 12 horas, e, similar ao gene beta 1,3 glucanase, ocorre pouca ou nenhuma expressão em 24 horas. Ocorre aumento considerável em 48 horas e esta mesma expressão se manteve em 72 horas com significativa diminuição em 96 horas.

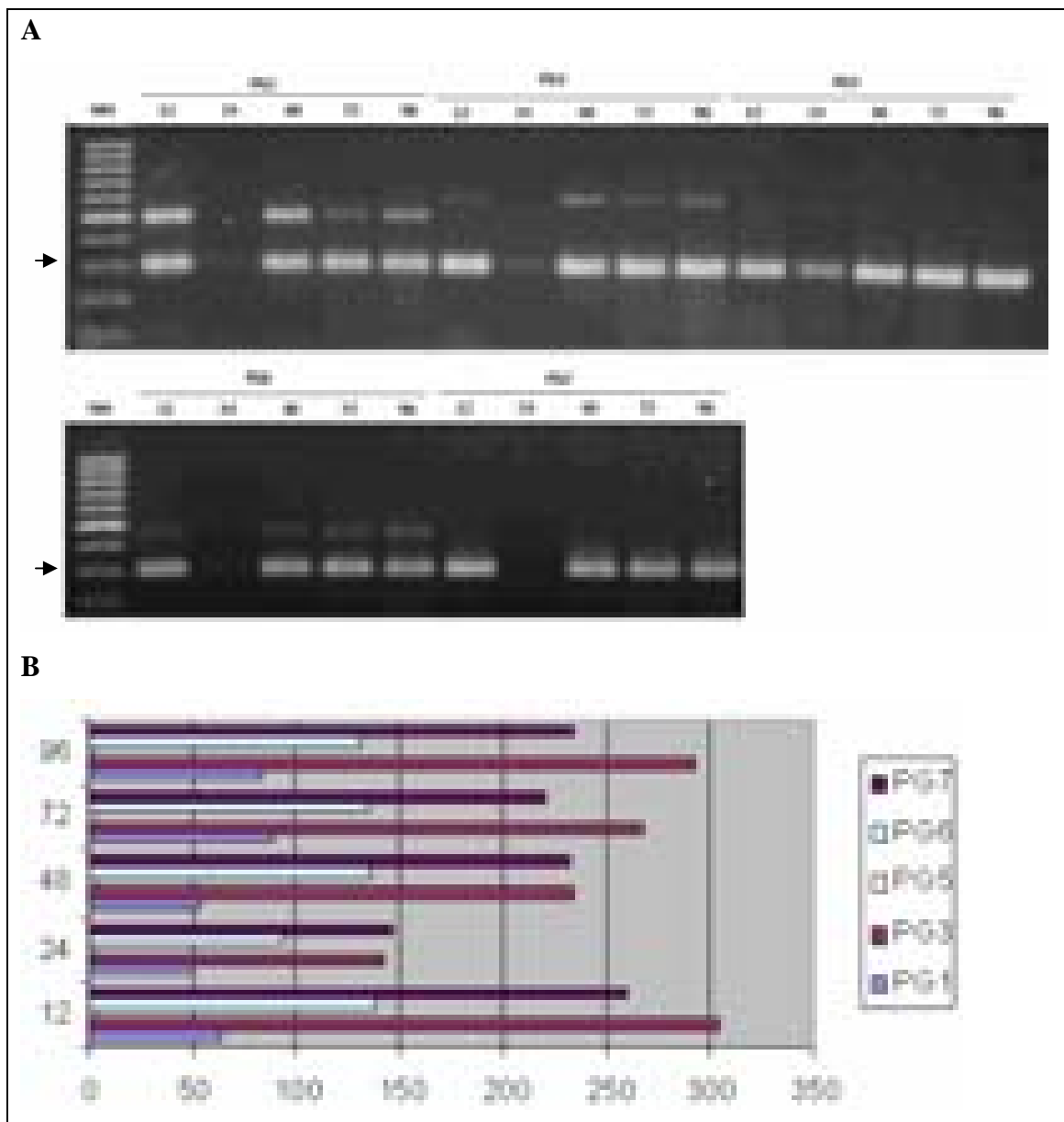


Figura 15 Análise da expressão de genes de poligalacturonase (PG), de *S. sclerotiorum* durante o crescimento em meio de cultura contendo 1% de extrato de parede. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1µg de RNA do fungo obtido da cultura de *S. sclerotiorum*. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5µL), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (PG1; PG3; PG5; PG6; PG7, β- 1,3 glucanase e β- 1,4 glucanase, respectivamente) e o gene constitutivo rDNA 28S (seta). 15µL da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Poços 1 e 5: RT-PCR feita a partir do mRNA de *S. sclerotiorum* cultivado em Meio mínimo suplementado com 1% de pectina (Sigma) por 12, 24, 48, 72 e 96 horas. MM: Marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder (Promega). **B-** Gráfico demonstrativo, por densitometria, da expressão dos genes de poligalacturonase (PG) *pg7*, *pg6*, *pg5*, *pg3* e *pg1* em *S. sclerotiorum* durante o crescimento em meio de cultura contendo 1% de extrato de parede. A expressão em porcentagem (%) foi determinada através da análise da densitometria. A densidade das bandas dos genes de PG e do rDNA constitutivo foram determinadas pelo programa específico (Scion Image ®). A diferença entre a densidade das bandas caracteriza a expressão no tempo determinado.

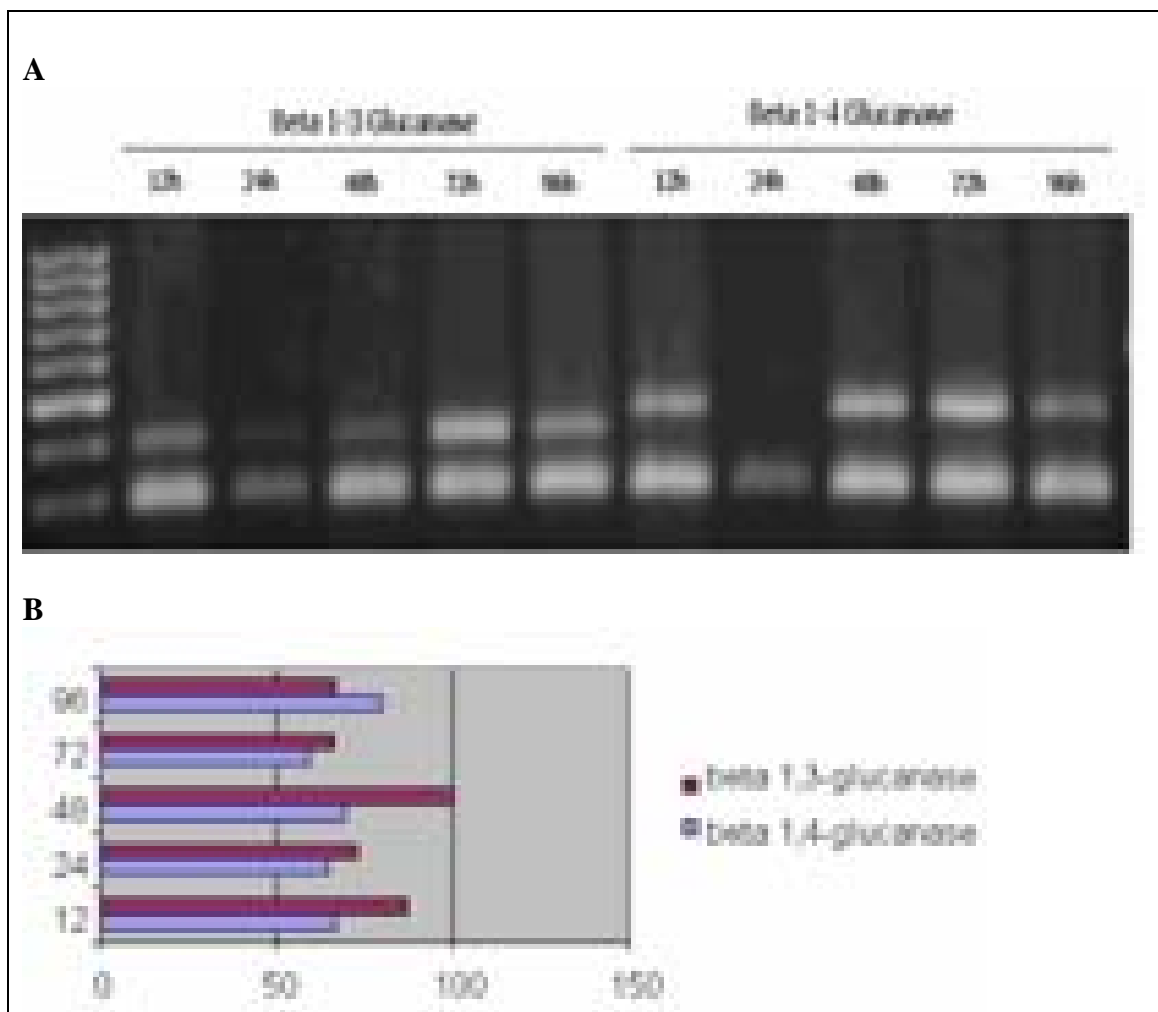


Figura 16- A- Análise da expressão de genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase de *S. sclerotiorum* durante o crescimento em cultura contendo extrato de parede a 1%. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 μ g de RNA do fungo obtido de plantas infectadas com *S. sclerotiorum*. As amostras foram retiradas com 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação de um fragmento do gene de interesse: *pg1*; *pg3*; *pg5*; *pg6*; *pg7*, β - 1,3 glucanase e β - 1,4 glucanase, respectivamente. 15 μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. MM: marcador molecular 1Kb (Promega). **B- Gráfico demonstrativo, por densitometria, da expressão dos genes de β - 1,3 Glucanase e β - 1,4 glucanase em *S. sclerotiorum* durante o crescimento em cultura contendo extrato de parede a 1% A expressão em porcentagem (%) foi determinada através da análise da densitometria. A densidade das bandas dos genes de PG e do rDNA constitutivo foram determinadas pelo programa específico (Scion Image ®). A diferença entre a densidade das bandas caracteriza a expressão no tempo determinado.**

5.0 Discussão

Muitos autores desenvolveram trabalhos que envolvem a produção enzimática e a expressão gênica de *Sclerotinia* em vários aspectos (COSTA, 1997; CARDOSO *et al.*, 1997; NELSON, 1998 ; VENETTE, 1998). Como um fitopatógeno, durante a interação fungo planta ocorre uma série de reações bioquímicas que direcionam o desenvolvimento da doença. Vários aspectos são abordados durante a pesquisa da interação fungo-planta, como por exemplo variações de pH, temperatura, grau de umidade do solo, tipo de enzima expressa bem como a variação temporal que envolve esta mesma expressão. Uma das abordagens e interesse da linha de pesquisa efetuada sobre *S. sclerotiorum* envolve a caracterização de genes expressos diferencialmente durante o processo de invasão bem como a ação das enzimas no desenvolvimento da doença. Desta forma, destacamos basicamente dois aspectos fundamentais na patogênese: a avaliação enzimática em particular àquela referida às poligalacturonases e beta glucanases , e a avaliação da expressão gênica das mesmas demonstradas a partir de perfis eletroforéticos.

5.1 O pH

É conhecida a importância do pH durante o processo de infecção (DUTTON, 1996; GODOY *et. al*, 1990 , BATEMAN & BEE'S, 1965 ROLLINS, 2001; COTTON *et. al* , 2003) Ocorre liberação de ácido oxálico e a manutenção de um pH ótimo pela acidificação do meio, garante condições suficientes para permitir a invasão. Em sua maioria, os trabalhos pesquisados caracterizam-se por determinar a ação deletéria do fungo em pH variando de 4,5 a 5,0. A exemplo disso, COSTA em 1997, a incidência de doenças causadas por fungos, sobretudo os patógenos de solo como a *S. sclerotiorum* é favorecida pelas temperaturas de 15 a 25 °C , bem como alta umidade e pH entre 4,5 – 5,0. A redução no pH do meio de cultura, observados nos diferentes experimentos, podem ser devidos a liberação do ácido oxálico pelo fungo *S. sclerotiorum* o que foi confirmado por COTON *et al.* (2003) e REJANE & HENRIK (2004) estudando o efeito do ácido oxálico produzido por *S. sclerotiorum* sob as células-guarda do tecido

vegetal, obtiveram resultados indicando valores que coincidem com os pontos de pH mais baixos (48 horas) obtidos em nosso experimento (Figura - 3). BRYAN e colaboradores (2007), testando diferentes monossacarídeos como fonte de carbono em cultura de *S. sclerotiorum*, obtiveram o mesmo padrão de pH apresentado na curva de crescimento obtida para o tratamento de glicose apresentada neste trabalho. Aqui, como é observado na figura 3, monitoramos o pH durante o experimento e obtivemos, de comum acordo com os demais autores, uma curva correspondente à nossa avaliação. O pH do sobrenadante de cultura durante o cultivo de *S. sclerotiorum* foi avaliado sob diferentes fontes de carbono. A indução foi feita em meio mínimo contendo: 1% pectina; 2% glicose, 1% extrato de parede celular de feijoeiro num tempo de cultivo: 0, 24, 48, 72, 96 e 240 horas e o pH oscilou em média de 2,76 a 5,63 numa temperatura à 20 ° C.

5.2 Poligalcturonases

As alterações bioquímicas sofridas no processo de invasão, são observadas pela ação combinada de uma série de enzimas capazes de promover a destruição da parede celular e, posteriormente necrose tecidual precedidas por variações no perfil de síntese protéica, sendo estas detectadas por ensaios enzimáticos e moleculares. Deste grupo enzimático destaca-se a ação das poligalacturonases (PGs). A atividade das PGs é induzida pela pectina ou monossacarídeos derivadas da pectina como o ácido galacturônico (ALGHISI & FAVARON, 1995). Diversas isoformas das poligalacturonases são produzidas por *S. sclerotiorum*, tanto em cultura, quanto em planta, entretanto, seu número total e propriedades diferem extensivamente entre os isolados fúngicos (CRUICKSHANK, 1983; RIOU, 1992; MARCIANO, 1983). Em nosso trabalho, a atividade enzimática das poligalacturonases no sobrenadante de cultura suplementado com pectina foi superior a atividade dos experimentos onde *S. sclerotiorum* cresceu na presença de glicose ou extrato de parede, fato este já confirmado em vários outros trabalhos (FRAISSINET-TACHET & FÈVRE, 1996; RIOU *et al.*, 1992). O pico de atividade máxima foi obtido no ponto de 48 horas após inoculação em meio contendo pectina, logo após uma queda com seguinte estabilização foram observados.

No tratamento contendo glicose não ocorreu aumento expressivo da atividade das poligalacturonases durante todo o período de teste (24 a 240 horas). Este fato pode ter ocorrido pela indução das poligalacturonases em *S. sclerotiorum* ser inibida pela presença de açúcares simples como a glicose (FRAISSINET-TACHED; FEVRE, 1996). Nessas condições o fungo não secreta poligalacturonases por não haver pectina no meio, assim a atividade da enzima no sobrenadante de cultura com glicose se torna baixa. A maior atividade das poligalacturonases no período de 48 horas de indução com pectina coincide com o estágio em que uma redução do pH é observada no sobrenadante de cultura. Isto se deve provavelmente a maior produção de ácido oxálico pelo fungo, o que ocasiona a ativação das poligalacturonases (BATEMAN & BEER, 1965; MAGRO et al., 1984; MARCIANO et al., 1983; MAXWELL & LUMSDEN, 1970). Concomitante com os ensaios da atividade enzimática foi determinado o perfil da expressão gênica. Os nossos resultados sugerem variação na expressão das PGs sob as diferentes fontes utilizadas. Durante o crescimento com pectina houve maior expressão destes genes quando comparadas com o crescimento em meio com extrato de parede. Isto pode ser devido à utilização não só da pectina como fonte de carbono para crescimento do fungo. A existência de outros compostos como proteínas e carboidratos pode ativar outras vias de degradação que não só a das pectinases para a obtenção de energia. A análise das atividades das poligalacturonases associadas à isolados de *S. sclerotiorum* demonstram arquitetura complexa consistindo de uma família de genes expressos em igual complexidade em resposta a diferentes estímulos nutricionais, físicos e bioquímicos (Li et al, 2004)

Diferenças significativas foram observadas e revelaram comportamentos diferentes sob diferentes condições de tratamento. A PG1 foi expressa em maior quantidade quando do crescimento em pectina, entretanto o mesmo gene apresentou expressão significativamente menor se o tratamento feito utilizou extrato de parede. O gene Pg3 foi expresso de forma irregular no tempo considerado se o substrato foi extrato de parede, porém com pectina esta mesma enzima obedece a uma expressão sob ponto de vista enzimático com pouca produção inicial (entre 12 e 24 horas), pico máximo em 48 e declínio finalmente em 96 horas. A pg5 manteve sua expressão ao longo do tempo no meio contendo pectina, e, em extrato de parede ela basicamente não se expressou. Semelhante ao comportamento bioquímico da pg3, a pg6 obedeceu a relação de pouca produção inicial e final com pico em 72 horas, se o substrato utilizado foi a pectina. Contudo, a pg6 em extrato de parede manteve seus níveis relativamente

equivalentes ao longo do tempo à exceção das 24 horas onde não houve nenhuma expressão. A pg7 em pectina, manteve também seus níveis de maior atividade aumentando progressivamente ao longo do tempo aumentando seus níveis em 48 e 96 horas respectivamente. A mesma enzima quando produzida em meio contendo extrato de parede teve sua produção irregular como observada nas figuras 13 e 15.. De modo geral a síntese das pectinases é induzida por substrato contendo pectina e é sujeita à repressão catabólica. Entretanto estudos bioquímicos tem revelado que individualmente a produção destas enzimas pectinolíticas não são produzidas concomitantemente e clara distinção pode ocorrer entre os genes constitutivos em resposta à substratos específicos (FRAISSINET-TACHET & FEVRE, 1996; RIOU et al., 1992a b,).

5.3 Beta glucanases

O mecanismo de ação das beta 1,3 e beta 1,4 glucanases, e suas relações com o processo de invasão não está completamente esclarecido. A presença de um indutor molecular adequado e a ausência de glicose são considerados essenciais para a produção das beta glucanases na maioria dos fungos como descreve PITSON et al, em 1993. Como visto anteriormente, em alguns fungos, as beta glucanases parecem ser constitutivas independente da fonte de carbono usada. Entretanto em outros pode haver aumento da produção destas enzimas pela presença de um substrato que não seja específico como por exemplo a quitina. A exemplo disso, temos o trabalho de DONZELLI & HARMAN, em 2001 estudando o fungo *Trichoderma atroviride* o gene que codifica a exo β (1,3) glucanase, gluc 78 foi expresso sob condições de restrição de nitrogênio e não na presença de substrato específico ou componentes relativos. Isto sugere que possam existir outros fatores relacionados à síntese das beta glucanases que não àquelas determinadas por fontes restritivas de carbono ou indução molecular. A produção destas enzimas pode ocorrer tanto intra quanto extracelular (SEVIOR et al.,1992; STONE & CLARKE, 1992). Juntamente com outros polímeros as beta glucanas participam na maioria dos componentes de parede celular de fungos promovendo rigidez e força à mesma (de NOBEL et al., 2001; SMITS et al., 2001; ADAMS, 2004). As glucanas são requisitadas para uma série de funções, as beta glucanas de origem citoplasmática ou extracelular provavelmente agem como fonte de carbono o qual é utilizado pelo fungo sob condições de restrições, o que sugere grande importância nas funções vitais (PITSON et al, 1993). MARTIN em 2007 descreve um

importante e completo trabalho descrevendo a bioquímica e a biologia molecular das beta glucanases (1,3 e 1,6). Pitoson (1993) ainda considera a necessidade de estudos que possam esclarecer a regulação de sua síntese bem como a multiplicidade de sua ação frente a diferentes estímulos, sejam de caráter nutricionais, de diferentes indutores ou mesmo de superfície. Em nosso trabalho, pelos resultados obtidos podemos verificar que houve produção das beta 1,3 e beta 1,4 sob indução em diferentes fontes de carbono. Houve elevada expressão das beta 1,3 glucanase e beta 1,4 glucanase, tanto no crescimento com pectina quanto com o crescimento com extrato de parede. Entretanto em 96 horas, a produção de beta 1,4 glucanase em extrato de parede celular foi em quantidade substancialmente maior quando comparada, no mesmo tempo transcorrido, à produção da mesma enzima sob indução com pectina. Cabe salientar, entretanto, que em 72 horas, ambas as enzimas, apresentaram relativa proporcionalidade em sua produção mesmo com induções diferentes. Tais mecanismos sugerem grande diversidade de ação pelo fungo frente às necessidades fisiológicas divergentes e/ou restritivas, e um complexo “*pool*” de enzimas atuando na patogênese. Nosso trabalho sugere um princípio avaliativo deste conjunto que possam nortear os caminhos determinados pelo fungo na invasão.

7.0 Perspectivas

Após os avanços e contribuições das metodologias aplicadas aos sistemas biológicos, sobretudo na área da biologia molecular, muitas considerações podem ser traçadas com referência ao estudo da interação planta hospedeiro e, em particular, aos fungos filamentosos. Sabe-se que os esforços dos pesquisadores que contribuem em sobremaneira com a nova formulação de defensivos agrícolas cada vez mais específicos contra o agente agressor que permita a conservação e estabilidade da biodiversidade local. Além disso, o estudo dos processos fitopatogênicos favorecem o conhecimento em franco desenvolvimento do controle biológico das doenças quando da interação entre microorganismos altamente competitivos. Com base nos aspectos básicos abordados no presente trabalho, podemos levantar algumas questões importantes, cuja as respostas estão ainda por serem identificadas. A exemplo disso, percebe-se claramente pontos ainda obscuros da expressão gênica frente a diferentes fontes de carbono. O fungo parece inativar e/ou suprimir suas atividade enzimáticas quando do abastecimento nutricional a uma fonte de carbono segura como a glicose, por exemplo. Desta forma pode-se optar por metodologias que permitam a variação de fatores que envolvem a indução: variações de pH, fonte de carbono disponível ou variações de precursores de processos constitutivos como o AMPc. Este, importante na manutenção das atividades intracelulares, varia sua atividade sob influencia de diversas substâncias como a cafeína.

Assim, estudos que permitam comparar atividade enzimática – expressão gênica e variação no conteúdo bioquímico utilizado serão altamente contribuintes para a pesquisa envolvendo não só fungos mas vários outros microorganismos e plantas. Outra questão a ser abordada é o conhecimento dos caminhos bioquímicos específicos realizados pelo fungo e/ou planta no processo infeccioso. A maneira pela qual parte destes caminhos são desenvolvidos são ainda desconhecidos. Poucos estudos foram elaborados em referência às beta 1,3 e beta 1,4 glucanases na invasão. Sabe-se de sua importância na fisiologia celular do fungo tanto extra quanto intracelularmente porém não é bem definido as rotas coordenadas ou não da ação das mesmas no fungo e/ou planta. Estudos futuros poderão ser elaborados para a verificação da ação co-dependente ou não entre elas como o que ocorre com as poligalacturonases incluindo espécies diferentes de fungos. A ação das enzimas não parece obedecer necessariamente padrões pré-definidos entre as diferentes espécies envolvidas. Além disso, as respostas reacionais da planta ao

processo de invasão, como as reações oxidativas, parecem contribuir fortemente na diversificação bioquímica que o fungo estabelece na patogênese dificultando ou mesmo anulando a ação enzimática. A identificação precisa das reações de defesa frente a enzimas específicas favoreceriam a compreensão mais detalhada da invasão e, portanto, controle da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S., GROGAN, R.G., 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**. v. 65, p.300, 1975.
- ADAMS DJ Fungal cell wall chitinases and glucanasaes. *Microbiology* **150**: 2029-2035, 2004.
- ADAMS, P.B., AYERS, W.A. *Sclerotinia sclerotiorum*: ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**. v. 69, p.896–899, 1979.
- AGUILAR, G., HUITRON, C. *Enz. Microbiol. Technol.* 9: 541, 1986
- ALGHISI, P. AND FAVARON, F. Pectin-degrading enzymes and plant parasite interactions. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 101, p.365–375, 1995.
- AMEY RC, MILLS PR, BAILEY A & FOSTER GD Investigating the role of a *Verticillium fungicola* β -1,6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. *Fungal Genet Biol* **39**: 264-27, 2003.
- BATEMAN, D.F.; An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia*-infected hypocotyls of bean. **Phytopathology**, v.54, p.438–445, 1964.
- BATEMAN, D. F. BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55, 204-211. 1965.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWITZ, B. & DINESH-KUMAR, S.P. Signalling in plant-microbe interactions. **Science** 276, 726-733. 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRYAN J.; NORBERT C.; STEVEN L.; Impact of nutritional supplements and monosaccharides on growth, oxalate accumulation, and culture pH by *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters (OnlineEarly Articles)**, 2007

CARDOSO, J. E.; RAVA, C. A. & SARTORATO, A. Doenças causadas por fungos de solo. In ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & VIMMERMAMM, M. J. O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. 1997.

COPA-PATINO, REYES F PEREZ-LEBLIC M. Purification and properties of a 1,3- β -glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *FEMS Microbiol Lett* **65**:285-292, 1989.

COTTON, P.; KASZA, Z.; BRUEL, C.; RASCLE, C.; FEVRE, M. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p.163-169, 2003.

COSTA, J. L. da S. Situação do mofo branco no feijão de inverno. In: **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO**, 5., 1996, Goiânia, GO. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, v. 2, p. 251-253. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 70) 1997.

CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentae**, Viçosa, v. 4, p. 69-133, 1964.

CHEN, H. Li., X-L & LJUNGDALHL LG. Sequencing of a 1,3-1,4 beta – D glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* an evidence that the gene has a bacterial origin. *Appl Envirom. Microbiol* 179: 6028-6034, 1997

CRUICKSHANK, R.H. Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80, 117-119, 1983.

CUTFIELD, S. M, DAVIES GJ.MURSHUDOV, G. , ANDERSON, B.F. MOODY, P.C. SULLIVAN PA. & CUTFIELD. The structure of the exo beta (1,3) glucanase

from *Candida Albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hidrolases. **J Mol. Biol.** **294** : 771-783, 1999

DE LA CRUZ J, PINTOR- TORO J, BENITEZ T, LLOBELL A & ROMERO L. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Thichoderma hazianum*. *J BaCTERIOLOGICAL* **177**: 6937-6945, 1995

DE NOBEL H, SIETSMA JH, VAN DEN ENDE H & KLIS FM. Molecular organization and construction of the fungal cell wall. *The Mycota, Vol VIII. A Comprehensive Theatise on Fungi as Expreimental Systems for Basic Applied Reseach* (Howard RJ & Gow NAR, eds), Springer, New York pp. 181-200..2001

DONZELLI & HARMAN. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Appl. Envriom. Microbiol.* **67**: 5643-5647, 2001.

DUTTON, M.V.; EVANS, C.S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the environment. **Can. J. Microbiol.** v.42, p.881-895, 1996.

FAVARON, F.; SELLA, L.; D'OVIDIO, R. Relationships Among Endo-Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. **The American Phytopathological Society**, v.17, n.12, p. 1402–1409, 2004.

FRAISSINET-TACHET, L. AND FÈVRE, M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Microbiol.** v.33, p.49–53, 1996.

FRAISSINET-TACHET L; REYMOND-COTTON P; FEVRE M. Characterization of a multigene family encoding an endo-galacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr Genet**, v. 29, p. 96-99, 1995.

GIL-AD N, BAR – NUN N & MAYER. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinera*: effects on the distribution of enzyme activities. *FEMS Microbiol Lett* **199**: 109-113, 2001.

GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* v.37, p.179-191, 1990.

HAMBLETON, S.; WALKER, C. & KOHN, L. M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999 – 2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Can. J. Plant Pathol.* V. 24, p. 309 – 315. 2002.

HEGEDUS, D.D.; RIMMER, S.R. *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiol Lett*, v.251 p.177–184, 2005.

HUNTER J. E.; DICKSON M. H.; CIGNA J. A. Limited-term inoculation: A method to screen bean plants for partial resistance to white mold. *Plant Dis.* v. 65, p. 414-417, 1984.

JONES, D. & WATSON D. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a phytopathogenic fungus. *Nature*, v. 224, p. 287 – 288. 1969.

LI, R., RIMMER, R., BUCHWALDT, L., SHARPE, A.G., SE´GUIN-SWARTZ, G. AND HEGEDUS, D.D. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genet. Biol.* v.41, p.754–765, 2004.

LOBO JUNIOR, M.; DE ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, 2002.

LUMSDEN, R.D. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization on infected bean. **Can. J. Bot.**, v. 54, p.2630–2641 1976.

MAGRO, P., MARCIANO, P.; DI LENNA, P. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiol. Lett.** v.24, p.9–12 1984.

MARCIANO, P., DI LENNA, P. AND MAGRO, P.; Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. **Physiol. Plant Pathol.** v.22, p.339–345 1983.

MARCIANO, P., Di Lenna, P., Magro, P., Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in vivo and in vitro. **Physiol. Plant Pathol.** 20, p.201-212, 1982.

MAXWELL, D.P. AND LUMSDEN, R.D.; Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, v.60, p.1395–1398 1970.

MIKLAS, P.N.; GRAFTON, K.F.; NELSON, B.D. Screening for partial physiological resistance to white mold in dry bean using excised stems. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v.117 p.321-327, 1992.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v.31, p.426-428, 1959.

MARTIN, K., McDOUGALL, B., McLLROY, S., JAYUS, CHEN, j. & SEVIOUR, R. J. Biochemistry and molecular biology of extracellular fungal β - (1,3) and β -(1,6) glucanases. **FEMS Microbiol. Rev** 31 p. 168-192, 2007.

NELSON, B. Biology of *Sclerotinia*. **Plant Pathology - Sclerotinia**. <http://www.ndsu.nodak.edu/plantpath/sclero.htm>. p. 1 - 3. 1998.

NUERO O, ALFONSO C, DEL AMO F & REYES. Syudy of β -1,3-glucanase activity during autolises of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. *Lett Appl Microbiol* **17**: 104-108, 1993.

PITSON SM, SERVIOR RJ & MCDUGALL BM. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physicolody and regulation. *Enz Microb Technol* **15**:178-190, 1993.

PURDY, L.H.. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology** v.69, p.875-880, 1979.

PUTZKE , J & PUTZKE, M. Os Reinos dos Fungos. 2 ed- Santa Cruz do Sul: EDUNISC, V.1. : il. 2004.

REESE E. Degradation of polymeric carbohydrates in microbial enzymes. Recent Advances in Phytochemistry, 11 (Loewus F & Runeckles V, eds), pp. 311-367. Plenum, New York, 1977.

RIDRUEJO JC, MUNOZ MD, ANDALUZ E & LARRIBA G, inhibition of yeast exoglucanases by glucosidase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 8: 179-185, 1989.

RUEL K & JOSELEAU. Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Pharmerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 374-384, 1991

REJANE L. E HENRIK U.; Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. **Plant Physiology**, v. 136, p.3703-3711 , 2004.

RIOU, C., FREYSSINET, G. AND FÈVRE, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.58, p.578–583, 1992.

ROLLINS, J.A.; DICKMAN, M.B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/ RIMI homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 75-81. 2001.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* 33: p. 323, 1976

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectines enzymes, In: Rose, A.H. (Ed). *Microbial Enzymes and Bioconversions*. London, 1980.

SCHMID F, STONE BA, MCDOUGALL BM, BACIC A, MARTIN KL, BROWNLEE RT, CHAI E & SERVIOR RJ. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1-3; 1-6)-beta-glucan from the micro fungus *Epioccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. *Carbohydr Res* **331**: 163-177, 2001.

SEVIOR R, STASINOPOULOS S, AUER D & GIBBS P. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* **12**: 279-298, 1992.

SMITS GJ, VAN DEN ENDE H & KLIS FM. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794, 2001.

STAHMANN K, PIELKEN P, SCHIMZ K & SAHM H. Degradation of extracellular beta-(1,3) (1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3347-3354, 1992.

STONE B & CLARKE A. *Chemistry and Biology of (1,3) beta-glucans*. La Trobe University Press, Melbourne, 1992.

STUBBS HJ, BRASCH DJ, EMERSON GW & SULLIVN PA. Hydrolase and transferase activities of the beta-1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. *Eur J Biochem* **263**: 889-895, 1999.

YAMAMOTO R & NEVINS D. Degradation of a glucan containing beta-(1-3) and beta-(1-6) linkages by an exo-(1-3)-beta-D-glucanase. *Carbohydr Res* 122: 217-226, 1983.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v: 69, n° 08, p. 904 – 907. 1994.

TOURNEAU, D.; Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* Species in culture. **Phytopathology**, v: 69, n° 08, p. 887 – 890. 1979.

VENETTE J. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. **Plant Pathology** - *Sclerotinia*. <http://www.ndsu.nodak.edu/plantpath/sclero.htm>. p. 3 - 5. 1998.

.

WILLETTS, H. J. & WONG, J. A. -L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Bot. Rev.** 46: 101-165. 1980.

WHITE, S., McINTYRE M, BERRY & McNEIL . The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit. Rev. biotechnol.* 22: 1-14, 2002.

WRATHER, J. A., ANDERSON, T. R., ARSYAD, D. M., TAN, Y., PLOPER, L. D., PORTA-PUGLIA, A., RAM, H. H., YORINORI, J. T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Can. J. Plant Pathol.** 23: 115 – 121. 2001a.

YANG, X. B., LUNDEEN, P., UPHOFF, M. D. Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis.** 83: 456 – 461. 1999.