


RUTH JANICE GUSE SCHADECK



**ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA GERMINAÇÃO,
LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA
E AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA FRAÇÃO
MICOSPORINA EM CONÍDIOS DE *Colletotrichum graminicola***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA

1999

RUTH JANICE GUSE SCHADECK

**ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA GERMINAÇÃO,
LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA
E AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA FRAÇÃO
MICOSPORINA EM CONÍDIOS DE *Colletotrichum graminicola***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutor em Bioquímica.

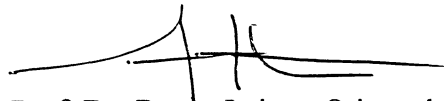
CURITIBA

1999

RUTH JANICE GUSE SCHADECK

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA GERMINAÇÃO, LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE
DA FOSFATASE ÁCIDA E AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA FRAÇÃO MICOSPORINA EM
CONÍDIOS DE *Colletotrichum graminicola*

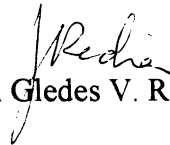
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo curso de Pós-Graduação em Ciências – Área **Bioquímica**, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Banca Examinadora composta por:



Prof. Dr. Breno Leite – Orientador – UFPR/ESALQ



Prof. Dr. José Domingos Fontana – UFPR



Profa. Dra. Carem Gledes V. Rechia – USP-Ribeirão Preto



Prof. Dr. Sergio Pascholati – ESALQ-USP



Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima – ESALQ-USP

Curitiba, 21 de outubro de 1999.

Orientador: Prof. Dr. BRENO LEITE

Com amor, a Marco, que tem a luz da vida,
a Pedro e João Francisco, jóias preciosas,
tesouros eternos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só aconteceu porque muitas pessoas estiveram ao meu lado, dando-me apoio afetivo, material e orientação técnica e científica. A todas elas dedico profunda gratidão:

A meu pai, que partiu durante este período, e deixou-me o exemplo da perseverança na luta pela vida. A minha mãe, que desde cedo ensinou-me que as mulheres precisam buscar a sua liberdade. À Jussara, pelo seu estímulo, suporte e companhia. Ao André, pela sua energia e juventude. Ao Lucídio, que agora é parte de minha família maior.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Breno Leite, que providenciou o objeto de estudo desta tese, por ter-me aceito como orientada, ter depositado sua confiança em mim, e assim ter-me permitido desenvolver o doutorado.

À Prof^a. Dr^a. Dorly de Freitas Buchi, com sua imensa alegria de viver. Pela colaboração competente nos experimentos de microscopia eletrônica, pelas horas gastas comigo ao microscópio durante a análise do material e pela discussão dos resultados. Sem a sua participação, parte desta tese não existiria.

A Prof^a. Dr^a. Glaci Therezinha Zancan, pelo seu conhecimento, apoio, exemplo e pelo brilho de seu olhar quando fala de ciência. Agradeço especialmente pela cuidadosa correção desta tese, enquanto membro da banca interna, e pelas sugestões que muito melhoraram este trabalho.

Ao Prof. Dr. Philip James Gorin, que sabiamente combina conhecimento e humanidade, pela sua dedicação na correção e reordenação da parte de caracterização estrutural desta tese. Seu apoio, acompanhamento e atenção extrapolaram, e muito, a função de membro da banca interna. Suas sugestões foram inestimáveis, e deram sentido a parte de caracterização estrutural.

Ao colega Cesar Augusto Tischer que, embora jovem, muito conhece. Agradeço profundamente a execução dos experimentos de RMN, ESI-MS e HPLC, a discussão dos

resultados, a paciência e o tempo que despendeu comigo. A caracterização preliminar da estrutura da fração isolada não teria sido possível sem sua participação e seu apoio.

Ao Prof. Marco Antonio F. Randi, pela sua inestimável colaboração nas técnicas de microscopia de luz, pelo auxílio nas análises e discussão dos resultados. Pelas leituras dos trabalhos e da tese, pelo suporte técnico em informática.

À Prof^a. Dr^a. Joana Léa M. S. Ganter, pela sua amizade, vontade de colaborar e pelas análises de HPSEC-MALLS.

Ao Dr. Paulo Janissek, do LAC /TEC, pelas análises de FTIR e pelo auxílio na discussão dos resultados. Pela sua disponibilidade e empenho.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela infraestrutura de laboratório, material e equipamentos, que especialmente neste último ano, estiveram irrestritamente a minha disposição, mesmo eu não fazendo parte do grupo da Biologia Molecular.

À Prof^a. Dr^a. Maria Benigna M. de Oliveira que, como coordenadora do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, deu-me suporte seguro, essencial nas etapas finais desta tese.

Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana pela sugestão do uso de DEAE Sephadex-A-50 e pelo fornecimento da mesma

À Janice, pela amizade, pela ajuda na análise de resultados, pelas leituras e correções de parte da tese. À Lauren, pela sua amizade e colaboração.

À Maria Lúcia e à Gisele, pela camaradagem e convivência no laboratório.

Ao técnico Walter Antônio de Baura, pelo seu sorriso e suporte técnico em incontáveis situações e pela sua constante disponibilidade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, especialmente à Dra. Daura, Matilde, Rose e Regina, pelo empenho e colaboração.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, pelo seu exemplo, sua generosidade e dedicação a uma idéia maior, a Universidade.

À Prof^a. Dr^a. Maria Célia Jamur, pela sua amizade, apoio e fornecimento do substrato para a reação citoquímica.

À Dr^a. Constance Olliver pela análise, leitura e sugestões relativas aos resultados do trabalho da fosfatase ácida.

À Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela competência de seus serviços, sem os quais é praticamente impossível fazer ciência.

Ao Departamento de Biologia Celular, que consentiu na liberação da maior parte de minhas atividades, especialmente aos colegas de disciplina que assumiram sobrecarga de aulas para que eu pudesse dedicar-me ao doutorado. A todos os demais colegas deste departamento pela convivência afetuosa, incentivo constante e amparo nas horas de turbulência.

Ao Departamento de Bioquímica que, no seu conjunto, acolheu-me e auxiliou-me em todos os aspectos. Inúmeros colegas, professores e técnicos, de todos os laboratórios, ajudaram-me nos mais diferentes aspectos. Não os listarei nominalmente, porque a relação seria excessivamente grande. Incontáveis pequenos e grandes gestos de generosidade e solidariedade permitiram que meu trabalho acontecesse, estando eu gestante por duas vezes. Esses gestos são preciosos e estarão para sempre guardados em meu coração.

A Deus e ao Universo pela saúde e proteção dada a mim e aos que amo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Características gerais dos conídios de <i>C. graminicola</i>	4
2.2 Fosfatase ácida em fungos	5
2.3 Germinação em fungos	11
2.4 Vacúolos em fungos	17
2.5 Endocitose em fungos.....	22
2.6 Vacuolização em conídios de <i>C. graminicola</i> e captação do vermelho neutro	23
2.7 Micosporinas	24
2.7.1 Características gerais das micosporinas em fungos	24
2.7.2 Micosporina-alanina em <i>C. graminicola</i>	29
3 OBJETIVOS	31
3.1.1 Objetivos gerais	31
3.1.2 Objetivos específicos	31
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Crescimento do fungo	33
4.2 Atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.....	33
4.2.1 Ensaio espectrofotométrico	33
4.2.2 Determinação das condições ótimas de atividade.....	34
4.3 Comparação da atividade da fosfatase ácida em conídios intactos e permeabilizados com triton X-100	35
4.4 Atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios germinados	36
4.5 Atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios de diferentes idades.....	37
4.6 Citoquímica para lipídios	37

4.7	Captação vacuolar de lipídios analisadas em microscopia de luz	38
4.8	Processamento para microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.)	38
4.9	Citoquímica para fosfatase ácida.....	39
4.10	Efeito do fluoreto de sódio sobre a formação de apressórios.....	40
4.11	Captação do vermelho neutro.....	41
4.12	Obtenção da fração micosporina	41
4.12.1	Cromatografia de troca iônica	43
4.12.2	Cromatografia de gel permeação	43
4.12.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	44
4.12.4	Cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS)	44
4.13	Caracterização estrutural da fração micosporina.....	45
4.13.1	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	45
4.13.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	46
4.13.3	Espectrometria de massa ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry).....	46
4.14	Ensaio biológico da fração micosporina	47
5	RESULTADOS	49
5.1	Determinação das condições ótimas de ensaio para a atividade da fosfatase ácida	49
5.2	Comparação da atividade da fosfatase ácida em conídios intactos e permeabilizados.....	55
5.3	Fosfatase ácida no homogenato durante a germinação.....	58
5.4	Atividade da fosfatase ácida no homogenato durante o envelhecimento dos conídios.....	60
5.5	Reservas nutricionais em <i>C. graminicola</i>	61
5.6	Características ultraestruturais da germinação	68
5.7	Análise citoquímica ultraestrutural da atividade da fosfatase ácida.....	73
5.7.1	Fosfatase ácida no conídio não germinado.....	73
5.7.2	Fosfatase ácida durante a germinação.....	77
5.8	Efeito do fluoreto sobre a formação de apressórios	80
5.9	A capacidade de endocitose	83
5.10	Captação do vermelho neutro: a dinâmica dos vacúolos em conídios vivos	84
5.11	Extração e obtenção da fração micosporina.....	87
5.12	Avaliação preliminar da estrutura da fração micosporina	92
5.12.1	Espectrometria de massa - ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry)	93
5.12.2	Análises monodimensionais e bidimensionais de RMN da fração micosporina.....	96
5.12.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	116

5.13	Ensaio biológico da fração micosporina	121
6	DISCUSSÃO	123
6.1	Atividade da fosfatase ácida em <i>C. graminicola</i>	123
6.2	Reservas nutricionais em <i>C. graminicola</i>	128
6.3	Características ultraestruturais da germinação	130
6.4	Análise citoquímica ultraestrutural da atividade da fosfatase ácida	135
6.4.1	Fosfatase ácida no conídio não germinado	135
6.4.2	Fosfatase ácida durante a germinação	140
6.5	A capacidade de endocitose	143
6.6	Captação do vermelho neutro: a dinâmica dos vacúolos em conídios vivos	144
6.7	Avaliação preliminar da estrutura da fração micosporina	145
6.8	Efeitos biológicos da fração micosporina	154
6.8.1	Considerações finais	155
7	CONCLUSÕES	156
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
9	ANEXOS - PUBLICAÇÕES	180

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da formação das estruturas de infecção de <i>C. lindemuthianum</i> sobre folhas de feijão.....	14
Figura 2 - Esquema representativo da membrana vacuolar de <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 3 - Esquema da extração metanólica.....	42
Figura 4 - Efeito do tempo sobre a atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.....	50
Figura 5 - Efeito da concentração de enzima sobre a atividade da fosfatase ácida do homogenato de conídios não germinados.....	50
Figura 6 - Efeito do pH sobre a atividade da fosfatase ácida em homogenato de conídios não germinados.....	51
Figura 7 - Efeito da temperatura sobre a atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.....	52
Figura 8 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.....	54
Figura 9 - Efeito da concentração de Triton X-100 sobre a permeabilização celular em conídios inteiros.....	56
Figura 10 - Efeito da temperatura sobre a permeabilização com Triton X-100.....	56
Figura 11 - Atividade da fosfatase ácida no conídio inteiro intacto e permeabilizado com Triton X-100.....	57
Figura 12 - Atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados e germinados.....	59
Figura 13 - Variação da atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados durante o envelhecimento.....	60
Figura 14 - Conteúdo intracelular de lipídios observados pela técnica de Sudan III	

em conídios em formação, com 15, 35 e 65 dias de idade	63
Figura 15 - Mobilização dos lipídios durante a germinação de conídios de <i>C. graminicola</i> monitorada pela reação citoquímica de Sudan III.	64
Figura 16 - Mobilização de lipídios e vacuolização durante a germinação de conídios demonstradas pela coloração com Sudan III e pós-coloração com verde rápido.	65
Figura 17 - Reservas nutricionais em conídios não germinados e germinados observados através de microscopia eletrônica de transmissão.....	67
Figura 18 - Aspectos ultraestruturais do processo de penetração.....	69
Figura 19 - Detalhes da ultraestrutura do apressório.	70
Figura 20 - Ultraestrutura da parede celular do apressório	72
Figura 21 - Produto de reação da fosfatase ácida: localização intravacuolar.....	74
Figura 22 - Captação de corpos lipídicos pelos vacúolos do conídio não germinado.	76
Figura 23 - Internalização de estruturas citoplasmáticas variadas em vacúolos de conídios não germinados.	77
Figura 24 -Produto da reação da fosfatase ácida no conídio germinado.....	79
Figura 25 - Produto de reação da fosfatase ácida em vacúolo do tubo germinativo.	79
Figura 26 - Produto de reação da fosfatase ácida em vesículas do apressório.....	79
Figura 27 - Produto de reação da fosfatase ácida em grande vesícula do apressório.	79
Figura 28 - Controle da reação da fosfatase ácida no apressório.	79
Figura 29 - Vesícula contendo produto de reação da fosfatase ácida justaposta à superfície celular do apressório.....	79
Figura 30 - Secreção de fosfatase ácida no apressório.....	79
Figura 31 - Efeito do fluoreto sobre a formação de apressórios.....	81
Figura 32 - Reversão da inibição da germinação dos conídios pelo fluoreto de sódio.....	82
Figura 33 – Provável vesícula endocítica em formação no conídio não germinado.	83
Figura 34 - Dinâmica da captação de vermelho neutro em conídios não germinados.	85

Figura 35 - Captação do vermelho neutro em conídios germinado	86
Figura 36 - Espectro de absorção no ultravioleta e visível (200-500 nm) de fração eluída em Sephacryl S-200.	88
Figura 37 - Perfis de eluição em HPLC da fração micosporina.	90
Figura 38 - Perfis da eluição de cromatografia de exclusão estérica acoplada à multidetectores (HPSEC-MALLS).	91
Figura 39 - Estrutura química das principais micosporinas derivadas de ácido glutâmico. ...	92
Figura 40 - Espectro de espectrometria de massa, ESI-MS no modo negativo, da fração micosporina.....	94
Figura 41 - Espectro de espectrometria massa, ESI-MS no modo positivo, da fração micosporina.....	95
Figura 42 - Espectro de ¹ H-RMN da fração micosporina, em D ₂ O, a 30° C.	102
Figura 43 - Espectro de ¹³ C-RMN da fração micosporina, em D ₂ O, a 30° C.	103
Figura 44 - Espectro simulado de ¹³ C-RMN da micosporina-glutamina.	104
Figura 45 - Correlações homonucleares e heteronucleares sugerindo a estrutura micosporina-glutamina.	109
Figura 46 - Espectro parcial da correlação HMQC mostrando os acoplamentos entre C-4 e H-4, C-6 e H-6, C-10 e H-10 e C-12 e H-12.	110
Figura 47 - Espectro parcial da correlação HMQC mostrando os acoplamentos entre C-7 e H-7, C-8 e H-8 e C-11 e H-11.	111
Figura 48 - Espectro parcial da correlação HMBC mostrando os acoplamentos entre C-2 e H-7.	112
Figura 49 - Espectro parcial da correlação HMBC mostrando os acoplamentos entre C-1 e H-6, C-9 e H-8 e C-13 e H-12.	113
Figura 50 - Espectro de COSY	114
Figura 51 - Espectro de TOCSY	115

Figura 52 - Espectro de FTIR da fração micosporina	119
Figura 53 – Identificação, pelo programa Pro Mentor-2.0, do grupamento carbonila de cetona no espectro de FTIR.	120
Figura 54 - Esquema especulativo do processamento dos lipídios pelos vacúolos.	138
Figura 55 - Comparação dos espectros de UV da micosporina-alanina e da fração micosporina.....	148
Figura 56 - Estrutura química da micosporina-glutamina, provável composto em maior concentração na fração micosporina isolada.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química geral de micoporinas.....	25
Tabela 2 – Estrutura química de micoporinas em fungos	27
Tabela 3 – Deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN de micoporinas relatados na literatura e encontrados nas análises da fração micoporina	105
Tabela 4 – Análise conjunta das correlações bidimensionais COSY, TOCSY, HMQC e HMBC	108
Tabela 5 – Efeito da fração micoporina sobre a germinação	119
Tabela 6 – Micoporinas purificadas e caracterizadas estruturalmente em fungos.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

COSY = Espectroscopia homonuclear de correlação (Correlation Spectroscopy)

δ (ppm) = Deslocamento químico (partes por milhão)

^{13}C -RMN = Ressonância magnética nuclear de carbono treze

ESI-MS = Espectrometria de massa de “electrospray ionization”

FTIR = Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

^1H -RMN = Ressonância magnética nuclear de próton

HMBC = Espectroscopia de correlação heteronuclear de múltipla ligação (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)

HMQC = Espectroscopia de correlação heteronuclear de ligação simples (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy)

HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência

HPSEC-MALLS = Cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos

J = Constante de acoplamento

M. E. T. = Microscopia eletrônica de transmissão

pNPP = p-nitrofenilfosfato de sódio

pNP = p-nitrofenol

TOCSY = Espectroscopia de correlação total homonuclear (Total Correlated Spectroscopy)

RESUMO

Conídios não germinados de *Colletotrichum graminicola*, fungo patógeno de milho, exibem grande número de corpos lipídicos no citoplasma. A atividade da fosfatase ácida presente no homogenato de conídios não germinados foi caracterizada. A enzima apresenta pH ótimo 5,5 e K_M para p-nitrofenilfosfato igual à 0,631 mM. A atividade da fosfatase ácida aumenta com o envelhecimento dos conídios, concomitantemente com a diminuição dos lipídios armazenados. Testes citoquímicos ultraestruturais mostraram o produto da reação citoquímica da fosfatase ácida, fosfato de cério, nos vacúolos de *C. graminicola*, o que sugere atividade lítica nestes compartimentos. Usando o produto de reação associado à face interna da membrana vacuolar como marcador de membrana, observa-se que os corpos lipídicos são internalizados pelo vacúolos em um processo análogo à microautofagia. As análises ultraestruturais sugerem que os lipídios captados são digeridos no interior do vacúolo. De maneira semelhante, outras estruturas citoplasmáticas são englobadas pelos vacúolos. Os conídios germinam e penetram na membrana de celofane, estabelecendo um modelo para o estudo do processo germinativo através de microscopia eletrônica de transmissão. Os corpos lipídicos desaparecem do conídio germinado e os vacúolos aumentam, simultaneamente com a deposição do produto de reação da fosfatase ácida. O apressório apresenta atividade da fosfatase ácida em múltiplas vesículas heterogêneas, a maioria justapostas aos corpos lipídicos. O apressório também secreta fosfatase ácida. Os conídios não germinados foram submetidos à extração e isolamento de micosporina. A extração com metanol seguida de cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 e em Sephacryl S-200 produziu uma fração heterogênea. O espectro de UV foi consistente com a presença de micosporina. O conjunto das análises monodimensionais de ^{13}C -RMN, ^1H -RMN e bidimensionais COSY, TOCSY, HMQC e HMBC sugerem a estrutura micosporina-glutamina como principal composto presente na fração isolada. Os deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos da estrutura são similares aos descritos na literatura para esta classe de compostos. Estes resultados estão em concordância com as análises de FTIR e ESI-MS. A fração isolada não tem efeitos sobre a germinação de conídios com 15 dias.

ABSTRACT

Ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of sorghum and corn, exhibited a large number of lipid bodies stored in their cytoplasm. The acid phosphatase activity of the homogenate obtained from the ungerminated conidia was characterized. It has an optimum pH of 5.5 and the K_M for p-nitrophenylphosphate is 0.631 mM. During aging the acid phosphatase activity increases and the lipids stored in the cytoplasm decrease. Cytochemical ultrastructural tests showed that ungerminated conidia vacuoles contain the cytochemical reaction product of the acid phosphatase, cerium phosphate, which is suggestive of lytic activity. The reaction product is associated with the internal face of the vacuole membranes. Using this product as a marker of the vacuole membrane, the lipid bodies were shown to be internalized by vacuoles in a process analogous to microautophagy. In this process, the vacuoles internalize and digest lipid bodies. Similarly, diversified cytoplasmic structures were internalized by vacuoles. The conidia are capable of germination and penetration into the cellophane membrane, establishing a model for the study of the germinative process, using transmission electron microscopy. The lipid bodies disappeared from the germinated conidia and the vacuoles enlarged concomitantly with deposition of the product of the acid phosphatase reaction. Appressoria also showed acid phosphatase activity in multiple heterogeneous vesicles. A number of these were juxtaposed with lipid bodies. In addition, appressoria secreted acid phosphatase. The ungerminated conidia were also extracted and the mycosporin isolated, as follows. Extraction was effected with methanol and the extract submitted to chromatography through DEAE-Sephadex A-50 followed by Sephacryl S-200. This methodology produced a heterogeneous fraction. Its UV spectrum was consistent with that of mycosporin. One-dimensional ^{13}C -RMN, ^1H -RMN and two-dimensional COSY, TOCSY, HMQC and HMBC analyses suggested a mycosporin-glutamine structure as a main component of the isolated fraction. These results were consistent with the FTIR and ESI-MS analyses. The isolated fraction did not have any effect on germination of conidium 15 day old.



Introdução

Revisão de Literatura

Objetivos

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum graminicola*, causador da antracnose em milho, produz esporos assexuados, os conídios falcados, e apresenta os seguintes aspectos relevantes: intensa vacuolização durante o envelhecimento (Leite, 1992; Mims *et al.*, 1995), armazenamento de grande quantidade de lipídios (Mims *et al.*, 1995) e a presença, na mucilagem, do composto micosporina-alanina com efeito de inibição da germinação (Leite & Nicholson, 1992). Estes três aspectos constituem as bases sobre as quais fundamenta-se a presente investigação.

A principal reserva nutricional endógena dos conídios são corpos lipídicos, os quais ocupam a maior parte do volume citoplasmático nos conídios jovens e diminuem durante o envelhecimento (Mims *et al.*, 1995). Concomitantemente com a diminuição de lipídios, acontece intensa vacuolização do citoplasma (Leite, 1992; Mims *et al.*, 1995) de maneira semelhante ao observado em *Colletotrichum gloeosporioides* (Kerrigan & Mims, 1993). Evidências sugerem que os vacúolos de fungos captam e digerem corpos lipídicos do citoplasma (Wilson *et al.*, 1980; Kerrigan & Mims, 1993). Recentemente foi demonstrada, em leveduras, a captação de componentes citoplasmáticos diretamente pela membrana vacuolar, fenômeno referido como microautofagia (Tuttle & Dunn; 1995; Chiang *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1997). Função digestiva tem sido atribuída a vacúolos de diferentes fungos (Wilson *et al.*, 1980; Kliensky *et al.*, 1990; Kerrigan & Mims, 1993), os quais apresentam uma variedade de enzimas hidrolíticas (Hänssler *et al.*, 1975; Wilson *et al.*, 1980; Kliensky *et al.*, 1990; Griffin, 1994), dentre as quais a enzima fosfatase ácida (Hislop *et al.*, 1974; Hänssler *et al.*, 1975; Rijn *et al.*, 1975; Linnemans *et al.*, 1977; Bojovic-Cvetic & Vujicic, 1982). A fosfatase ácida é uma glicoproteína de baixa especificidade, com peso molecular variável e que atua em pH ácido (Barbarié *et al.*, 1984; Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1994), produzindo fosfato inorgânico, a partir da hidrólise de ésteres de fosfato (Trimble *et al.*, 1981; Barbarié *et*

al., 1984; González *et al.*, 1993). A fosfatase ácida tem sido extensivamente estudada durante a germinação de sementes vegetais, quando observa-se grande aumento da atividade da mesma (Teno & Rossi, 1987; Bhargava & Sachar, 1987; Clarke & Laidman, 1991; Bose & Taneja, 1998). Em contraste, poucos trabalhos investigaram a enzima durante a germinação de fungos (Tronchin *et al.*, 1989; Nahas, 1989). A enzima fosfatase ácida, quando presente em compartimentos líticos, tem sido utilizada como parâmetro no estudo da atividade lisosomal (Yamamoto *et al.*, 1981; Sangwan *et al.*, 1989; Jordan & DeVay, 1990). Em vista do exposto, optou-se por investigar em conídios não germinados de *C. graminicola* o envolvimento dos vacúolos na mobilização das reservas lipídicas, caracterizar a atividade da fosfatase ácida e determinar a sua localização celular, bem como monitorar a mobilização de lipídios e a atividade enzimática durante a germinação.

O outro aspecto da presente investigação fundamenta-se na presença de micosporina-alanina na mucilagem dos conídios (Leite, 1992; Leite & Nicholson, 1992). As micosporinas são metabólitos isolados de diversos grupos de fungos (Arpin & Bouillant, 1988; Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Favre-Bonvin *et al.*, 1987). A relação entre luz, síntese de um composto denominado P-310 e a esporulação foi estabelecida desde os primeiros estudos com micosporinas (Dehorter, 1976; Leach, 1965; Tan & Epton, 1974) até períodos mais recentes (Fayret & Vito, 1981; Pittet *et al.*, 1983a; Dehorter & Bernillon, 1983). Atribui-se também as mesmas a função de proteção contra radiação ultravioleta (Brook, 1981; Young & Patterson, 1982). A mais nova micosporina identificada, a micosporina-alanina na mucilagem de conídios de *C. graminicola*, apresenta efeito auto-inibidor de germinação em conídios jovens, e estimulador da germinação em conídios velhos (Leite, 1992; Leite & Nicholson, 1992). As micosporinas estão bem caracterizadas em termos de aspectos estruturais (Arpin *et al.*, 1979; Arpin & Bouillant, 1988; Bernillon *et al.*, 1984; Fayret & Vito, 1981). Apresentam alta solubilidade em água e são constituídas de um anel ciclohexanona substituído, ligado a um

aminoácido ou um de seus derivados (Arpin *et al.*, 1979; Bernillon *et al.*, 1984). A maioria das micosporinas foi isolada a partir do micélio em esporulação, sendo extraídas com etanol ou metanol absolutos (Trione & Leach, 1969; Bouillant *et al.*, 1981; Young & Patterson, 1982) ou com misturas hidro-etanólicas ou hidro-metanólicas (Tsujino *et al.*, 1978; Pittet *et al.*, 1983a; Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Buscot & Bernillon, 1991). Por outro lado, a micosporina-alanina foi purificada a partir da mucilagem separada dos conídios de *C. graminicola*, usando água como único solvente (Leite & Nicholson, 1992). Assim, a extração de micosporina através do uso de metanol e subsequente isolamento da fração micosporina passa a ser um abordagem interessante, para de posse desses dados, verificar se a fração isolada através destas técnicas apresenta a mesma estrutura e o mesmo efeito biológico da micosporina-alanina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CONÍDIOS DE *C. graminicola*

A principal característica da massa de conídios produzida por espécies de *Colletotrichum* é a presença de material mucilaginoso envolvendo cada conídio (Griffiths & Campbell, 1972; Nicholson & Moraes, 1980; McRae & Stevens, 1990; Nicholson & Epstein, 1991; Bailey *et al.*, 1992). Esta mucilagem tem a função geral de proteção dos esporos contra dessecação e contra o efeito de produtos tóxicos gerados durante o curso do desenvolvimento de lesões nas plantas (Nicholson & Moraes, 1980; Nicholson *et al.*, 1986, 1989), sendo produzida durante a esporulação (Nicholson & Moraes, 1980; Nicholson *et al.*, 1989; Nicholson, 1992). Além disso, apresentam enzimas como esterases não específicas com atividade de cutinase (Pascholati, 1993; Pascholati *et al.*, 1995) e altas concentrações de micosporina-alanina, metabólito com função de auto-inibidor da germinação (Leite & Nicholson, 1992).

Nos últimos anos, alguns estudos têm abordado a organização citológica em espécies de *Colletotrichum*. Observações ao microscópio óptico de polarização demonstraram que conídios jovens de *C. graminicola* apresentam numerosas pequenas vesículas, enquanto conídios velhos apresentam grandes vacúolos (Leite, 1992). A vacuolização observada durante o envelhecimento e outros detalhes ultraestruturais foram demonstrados por Mims *et al.*, (1995). Os conídios jovens apresentam grande número de pequenos vacúolos contendo material denso e elevado número de gotículas lipídicas. Estes depósitos lipídicos podem apresentar-se como estruturas arredondadas com margens lisas ou irregulares. Durante o envelhecimento, o número de corpos lipídicos diminui, enquanto os vacúolos aumentam de

tamanho. Conseqüentemente, o volume citoplasmático de conídios velhos é ocupado por grandes vacúolos, apresentando também vacúolos autofágicos (Mims *et al.*, 1995). De maneira semelhante, conídios jovens de *C. gloeosporioides* exibem o citoplasma repleto de lipídios e numerosos pequenos vacúolos, enquanto conídios velhos apresentam menor número de corpos lipídicos e dois grandes vacúolos, localizados um em cada lado do núcleo central (Kerrigan & Mims, 1993).

Além dos lipídios, também são observados no citoplasma de conídios jovens de *C. graminicola* mitocôndrias, microcorpos, pequenos vacúolos, corpos multivesiculares, retículo endoplasmático granular e agranular, vesículas que parecem corresponder a elementos do Golgi e “Woronin bodies” (Mims *et al.*, 1995). “Woronin bodies” são organelas membranosas encontradas especificamente em fungos (Gow & Gadd, 1995). Foram verificadas poucas diferenças na organização destas organelas durante o envelhecimento de conídios de *C. graminicola* (Mims *et al.*, 1995). Destaca-se a extensiva agregação de retículo endoplasmático tubular nos conídios velhos. A parede celular exibiu similaridades em ambas as idades comparadas, sendo formada por uma camada interna espessa, elétron transparente, e uma camada externa muito fina com fibras elétron densas. Conídios de *Colletotrichum truncatum* exibem características semelhantes às de *C. graminicola*. Apresentam o mesmo formato em meia lua, são envoltos por mucilagem, o citoplasma contém grande número de gotículas de lipídios e exibem similar organização citológica (Van Dyke & Mims, 1991).

2.2 FOSFATASE ÁCIDA EM FUNGOS

A fosfatase ácida é uma enzima amplamente encontrada na natureza (Biswas & Cundiff, 1991). Presente em inúmeros fungos, (Huguenin *et al.*, 1982; Schönholzer *et al.*, 1985; Trimble *et al.*, 1981; Moran *et al.*, 1989; Famurewa & Olutiola, 1994) tem sido

purificada como a partir de *Yarrowia lipolytica* (Moran *et al.*, 1989), *Candida lipolytica* (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993), *Aspergillus flavus* (Famurewa & Olutiola, 1994) e *Aspergillus nidulans* (Nozawa *et al.*, 1998). Em isolados de *Colletotrichum falcatum* e *C. graminicola* verificou-se a existência desta enzima através de zimogramas, sendo a mesma usada para classificação taxonômica (Huguenin *et al.*, 1982).

A fosfatase ácida hidrolisa ésteres de fosfato produzindo fosfato inorgânico (Arnold & Garrinson, 1979; Trimble *et al.*, 1981; Moran *et al.*, 1989; Biswas & Cundiff, 1991), um metabólito chave no desenvolvimento celular (Mann, 1944; Biswas & Cundiff, 1991; Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993). Estudos pioneiros demonstraram que em *Aspergillus niger* a variação de fosfato no meio afeta o metabolismo de nitrogênio, carbono e a respiração (Mann, 1944). O mesmo autor relata a presença de fosfatos armazenados e de uma fosfatase que atua em pH ácido sobre diferentes substratos. Significativamente, a enzima fosfatase ácida atua em pH ácido (Pasqualini *et al.*, 1992; Famurewa & Olutiola, 1994). O fosfato inorgânico, produto da hidrólise, é um importante regulador de sua expressão. Por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*, o gene *PHO5* codifica a expressão da fosfatase ácida reprimida por fosfato inorgânico (Uesono *et al.*, 1992).

A fosfatase ácida é uma enzima de baixa especificidade, hidrolisando ésteres de fosfato naturais como glucose-6-fosfato, ATP, AMP, UMP, pirofosfato e substratos artificiais como α -naftilfosfato e p-nitrofenilfosfato (Moran *et al.*, 1989; Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993). A baixa especificidade confere a enzima papéis fisiológicos que variam dependendo de sua localização. Em associações de plantas com ecto-micorrizas atribui-se à fosfatase ácida das micorrizas a hidrólise de fosfatos orgânicos e o aumento da captação do fosfato pela célula hospedeira (Periasamy & Raman, 1995). Na mesma linha, a enzima secretada por microorganismos do solo desempenha importante função na liberação de fosfato dos compostos presentes neste local (Straker & Mitchell, 1986; Tarafar *et al.*, 1995), aumentando

a captação de nutrientes e o crescimento pela planta (Tarafar *et al.*, 1995). Em células meristemáticas de raiz de plantas, quando localizada intracelularmente, a fosfatase ácida tem sido considerada um regulador do *turnover* de fosfato inorgânico dentro das células (Szabo-Nagy *et al.*, 1987).

A enzima apresenta pH ótimo ácido. Por exemplo, o pH ótimo em *C. lipolytica* é 5,8 (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993), em *Y. lipolytica* é 5,5 (Galabova *et al.*, 1994) e em *A. niger* é 4,0 (Famurewa & Olutiola, 1994). A fosfatase ácida obtida de diferentes organismos é fortemente inibida por fluoreto (Panara *et al.*, 1990; Biswas & Cundiff, 1991; Pasqualini *et al.*, 1992; Famurewa & Olutiola, 1994). Apresenta termoestabilidade, como observado em *C. lipolytica* (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993) e *Y. lipolytica* (Galabova *et al.*, 1994). Inúmeros trabalhos demonstram ser esta uma glicoproteína, com elevado teor de carboidratos. Por exemplo, a fosfatase ácida de *Rhodotorula glutinis* é composta por 60% de proteína, 5% N-acetil glucosamina, 35% de manose (Trimble *et al.*, 1981). Similarmente, a enzima em *C. lipolytica* apresenta 65% de açúcares neutros (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993).

A fosfatase ácida intracelular em microorganismos é normalmente ensaiada em frações obtidas a partir do rompimento das células (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993; Galabova *et al.*, 1993). Entretanto, o rompimento celular nem sempre é fácil e rápido, onerando e dificultando a metodologia. Em contraste, a permeabilização celular evita as complicações do fragmentação celular, embora seja pouco usada no estudo da fosfatase ácida em fungos (Ram *et al.*, 1983; Galabova *et al.*, 1993). É um método que não se aplica para uma mesma enzima em diferentes organismos e nem sempre são encontradas as condições ótimas de permeabilização com manutenção da atividade desejada (Ram *et al.*, 1983; Galabova *et al.*, 1993). Deve-se considerar que o organismo pode apresentar diferentes comportamentos diante dos agentes permeabilizantes, dependendo do estágio em que se encontra. Em *C. albicans*, a permeabilização com mistura tolueno/etanol/Triton X-100 foi utilizada para estudos de

diferentes enzimas, inclusive fosfatase ácida (Ram *et al.*, 1983). Pelo acima exposto, a permeabilização celular é uma abordagem útil e prática no estudo da fosfatases ácida em fungos.

Em contraste com o grande número de trabalhos demonstrando citoquimicamente a atividade da fosfatase ácida em células animais, poucos trabalhos localizam esta atividade em fungos. Pode-se citar a presença da mesma em vacúolos e vesículas. Hänssler *et al.* (1975) demonstraram, em hifas de *Sclerotium rolfii*, numerosos vacúolos marcados pela reação para fosfatase ácida, os quais parecem ser interconectados. Neste caso, os autores consideram estes vacúolos como parte do sistema lisosomal do fungo, sugerindo que a função primária destes vacúolos está relacionada com processos catabólicos e mobilização de reservas nutritivas. Similarmente, em protoplastos de *S. cerevisiae* esta atividade foi demonstrada em pequenos vacúolos e no vacúolo central (Rijn *et al.*, 1975). Também na levedura intacta esta atividade é observada no vacúolo central (Linnemans *et al.*, 1977). A presença da enzima também está demonstrada em vacúolos de *A. flavus* (Bojovic-Cvetic & Vujicic, 1982), de basidiósporos dormentes de *Psilocybe cubensis* (Ruch & Motta, 1987) e de hifas de *Gigaspora margarita* (Saito, 1995).

Além da localização intravacuolar, a enzima fosfatase ácida é encontrada em inúmeras outras estruturas celulares de fungos. Em protoplastos de *S. cerevisiae* está presente no retículo endoplasmático, em vesículas semelhantes a Golgi e na superfície do protoplasto. A localização na superfície do protoplasto pode ocorrer em função da lise ou estar relacionada com a síntese de parede celular (Rijn *et al.*, 1975). Na levedura intacta também é observada em estruturas do Golgi, vesículas e parede celular (Linnemans *et al.*, 1977). A localização de fosfatase ácida ativada por Fe^{3+} no espaço periplasmático foi demonstrada citoquimicamente em *Saccharomyces rouxii* (Arnold & Garrinson, 1979). No referido trabalho, os autores consideram que a função primária das fosfatases ácidas em leveduras está ligada à hidrólise

de ésteres de fosfato extracelulares que não atravessam a membrana plasmática. Em basidiósporos dormentes de *P. cubensis*, a atividade também foi detectada ao longo da membrana plasmática, entre a membrana plasmática e a parede celular, bem como na própria parede celular (Ruch & Motta, 1987). Além disso, fungos e leveduras, como *Neurospora crassa* (Nahas *et al.*, 1982), *S. cerevisiae* (Schönholzer *et al.*, 1985) e *A. niger* (Famurewa & Olutiola, 1994), secretam fosfatase ácida. Em associação de raízes com ectomicorrizas também tem sido demonstrada a presença desta atividade enzimática. Segmentos de raízes de *Pinus pinea* associadas com *Tuber albidum*, apresentam a marcação citoquímica ao longo da membrana plasmática da hifa, enquanto métodos bioquímicos caracterizaram as propriedades da mesma (Pasqualini *et al.*, 1992)

Poucos trabalhos abordam esta atividade enzimática durante a germinação em fungos. Em *Candida albicans* foi demonstrado que a atividade da fosfatase ácida localiza-se no blastoconídio, preferencialmente no espaço periplasmático e membrana plasmática, ao passo que na célula germinada a atividade desaparece do corpo do conídio e é encontrada com forte marcação ao longo do tubo germinativo (Tronchin *et al.*, 1989). Os autores consideram que esta enzima poderia estar envolvida na reorganização da parede celular, catalisando a defosforilação de fosfoproteínas. Através de métodos puramente bioquímicos, também foi observado aumento desta atividade em *N. crassa*, tanto no conídio quanto no meio de cultura, sendo que a função da enzima secretada seria hidrolizar ésteres de fosfato resultantes da decomposição de compostos na natureza, quando o fosfato solúvel cai a limites críticos (Nahas, 1989).

Em contraste com a pouca informação sobre a fosfatase ácida durante a germinação em fungos, em germinação de sementes vegetais a mesma tem sido bastante estudada. Aumento nesta atividade durante a germinação de sementes vegetais tem sido demonstrada em diferentes espécies. Em milho, Teno & Rossi (1987) sugerem que o aumento observado

durante a germinação deve-se a modificações na molécula da enzima. Em algodão foi verificado um aumento de 16 vezes desta atividade nos primeiros estágios da germinação, o qual é bloqueado por ciclohexamida, demonstrando que a atividade de transcrição é essencial para a indução desta atividade enzimática (Bhargava & Sachar, 1987). Em *Vigna sinensis* foi verificado o aumento da fosfatase ácida, bem como a presença de quatro isoformas com propriedades bioquímicas semelhantes (Biswas & Cundiff, 1991). Em grãos de aleurona, que armazenam proteínas e fitina, isolados de sementes de trigo, observa-se um aumento de 7 vezes na atividade da enzima nas primeiras 4 horas de germinação (Clarke & Laidman, 1991). Em sementes de lentilha, a atividade da fosfatase ácida aumenta 10 vezes durante a germinação (Bose & Taneja, 1998).

Variações da fosfatase ácida presente em vacúolos autofágicos têm sido observadas em processos de diferenciação celular em diferentes organismos (Hatano *et al.*, 1983; Yamamoto *et al.*, 1981; Gunawardana, 1992; Bucher & Hofer, 1993; Hakaby *et al.*, 1994). Durante a diferenciação celular de *Dictyostelium discoideum*, (Mixomiceto), a atividade da enzima aumenta e sua estrutura sofre modificações pós-traducionais, além de observar-se a síntese de novas isoenzimas (Knecht *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1985). Também em processos de autólise observa-se o aumento da atividade enzimática, como em *S. cerevisiae*, onde a proteinase A e fosfatase ácida vacuolares aumentam de 5 a 10 vezes a sua atividade inicial (Sato & Ohta, 1985). Além disso, foi sugerido em *Pycnoporus cinnabarinus* que a fosfatase ácida secretada está envolvida na ramificação das hifas no meio de cultura (Jones *et al.*, 1995).

Pelo acima expostos fica claro que a fosfatase ácida sofre modificações durante de diferenciação celular, a germinação de sementes vegetais e em processo de autólise. A germinação de fungos é considerada um modelo de diferenciação celular em células eucarióticas (Weete, 1974), porém nenhuma informação sobre a presença de atividade da

fosfatase ácida no conídio germinado e apressório foi encontrada na literatura. Em função disso, torna-se interessante caracterizar a atividade da fosfatase ácida em conídios de *C. graminicola* e analisar a evolução desta atividade enzimática durante o processo germinativo e no envelhecimento.

2.3 GERMINAÇÃO EM FUNGOS

Fungos patógenos de plantas invadem os tecidos hospedeiros através de uma variedade de estruturas especializadas de infecção. Na maioria dos fungos é observado o desenvolvimento do apressório, estrutura de infecção a partir da qual forma-se a hifa de penetração (Hoch & Staples, 1987), como em *Colletotrichum* sp (Politis & Wheeler, 1973; Politis, 1976; Van Dyke & Mims, 1991). A germinação de esporos pode ser dividida em fases que envolvem, genericamente, absorção de água, aumento da atividade metabólica, e subsequente formação das estruturas de infecção (Weete, 1974; Hoch & Staples, 1987).

Os eventos morfológicos da germinação são acompanhados de importantes mudanças na síntese de macromoléculas e na respiração (Griffin, 1994). A síntese de ácidos nucleicos e de novas proteínas no processo germinativo tem sido demonstrada em diferentes fungos (Smith & Berry, 1974; Hoch & Staples, 1987; Leger *et al.*, 1989; Griffin, 1994). Por exemplo, em *Metarhizium anisopliae*, a tricotecina, inibidor de síntese protéica, inibe a formação de tubo germinativo, enquanto a hidroxauréia, inibidor da síntese de DNA, e a tunicamicina, inibidor de glicosilação, inibem a formação de apressórios (Leger *et al.*, 1989). Em alguns casos parece ocorrer armazenamento de mRNA no citoplasma do esporo, uma vez que ocorre intensa síntese de proteínas sem síntese detectável de RNA (Griffin, 1994).

Durante a germinação observa-se grande aumento na respiração (Smith & Berry, 1974). Por exemplo, em *N. crassa* o aumento na velocidade respiratória é coincidente com a

emergência do tubo germinativo (Griffin, 1994). Assim, as inúmeras mudanças no metabolismo das células durante o processo germinativo apresentam, como características marcantes, ativação dos processos de síntese e grande consumo de energia.

Após a adesão e o inchamento do esporo, forma-se o tubo germinativo (Hoch & Staples, 1987). Esta estrutura tubular apresenta citoplasma bem organizado (Hoch & Staples, 1987; Mendgen & Deising, 1993), e na sua extremidade apical ocorre contínua secreção de componentes da parede celular, a qual torna-se rígida a medida que a hifa alonga-se para frente (Mendgen & Deising, 1993). Abundante matriz extracelular envolve o tubo germinativo e tem a provável função de aderir o mesmo à superfície hospedeira (Mims & Richardson, 1989; Chaubal *et al.*, 1991; Bourett & Howard, 1990; Van Dyke & Mims, 1991). A extensão do tubo germinativo é variável e, quando a extremidade do tubo germinativo conecta-se à superfície hospedeira, diferencia-se no apressório (Van Dyke & Mims, 1991; Griffin, 1994). A indução da formação do apressório ocorre por variados estímulos, que podem ser químicos ou físicos, como a topografia do hospedeiro (Hoch & Staples, 1987; Mendgen & Deising, 1993). Durante o desenvolvimento apressorial, um septo pode ser formado separando o tubo germinativo do apressório (Hoch & Staples, 1987; Van Dyke & Mims, 1991; Mendgen & Deising, 1993).

Alguns estudos mostram detalhes da organização citológica do apressório. Em *Magnaporthe grisea*, germinado sobre membrana de celofane, observa-se presença de numerosas vesículas, mitocôndrias, corpos multivesiculares, ribosomas e microtúbulos (Bourett & Howard, 1990). Organização semelhante é observada no apressório de *Gymnosporangium juniperi-virginianae* (Mims & Richardson, 1989). A infecção, por *C. graminicola*, de folhas de milho e folhas de aveia resistentes já foi reportada através de microscopia eletrônica de transmissão (Politis, 1976; Politis & Wheeler, 1973). Embora o enfoque dos autores tenha sido centrado sobre o processo de invasão dos tecidos, alguns

detalhes da organização do apressório foram observados. Verifica-se a presença de corpos lipídicos, mitocôndrias, ribosomas e vacúolos (Politis & Wheeler, 1973).

O apressório está firmemente aderido à superfície de germinação (Bourett & Howard, 1990; Van Dyke & Mims, 1991; Mendgen & Deising, 1993). A adesão parece ser mediada por matriz extracelular, observada através de microscopia eletrônica, como em *C. truncatum* (Van Dyke & Mims, 1991) e em outros fungos (Bourett & Howard, 1990; Mendgen & Deising, 1993). Recentemente foi verificada a presença de uma glicoproteína de alto peso molecular rica em manose na matriz extracelular de *C. graminicola* (Sugui *et al.*, 1998). Na base do apressório observa-se uma região destituída de parede celular denominada de poro, fato amplamente observado em outros fungos (Mims & Richardson, 1989; Bourett & Howard, 1990; Van Dyke & Mims, 1991; Mendgen & Deising, 1993). Em *C. graminicola* germinado sobre folhas a existência do poro foi sugerida, embora as imagens não mostrem justaposição da membrana plasmática do poro com a superfície do hospedeiro (Politis, 1976; Politis & Wheeler, 1973).

Hifa de penetração é um termo equivalente a “peg” de penetração e hifa de infecção (Mendgen & Deising, 1993). A hifa de penetração é a estrutura que efetivamente invade o hospedeiro e é formada a partir de expansão citoplasmática do apressório, na região do poro (O'Connell *et al.*, 1985; Mims & Richardson, 1989; Bourett & Howard, 1990; Van Dyke & Mims, 1991; Mendgen & Deising, 1993). Em *C. graminicola* germinado sobre folhas de milho observou-se que a hifa de penetração atravessa a papila (estrutura formada entre membrana plasmática e parede celular, apresentando lignina) e invade as células, embora os detalhes ultraestruturais desta hifa não tenham sido observados ou abordados (Politis & Wheeler, 1973). Em *Colletotrichum lindemuthianum* observa-se, após a invasão do tecido pela hifa de penetração, a formação da vesícula de infecção com subsequente formação da hifa

primária (O'Connell *et al.*, 1985). No esquema abaixo, observamos as estruturas de infecção em *C. lindemuthianum*.

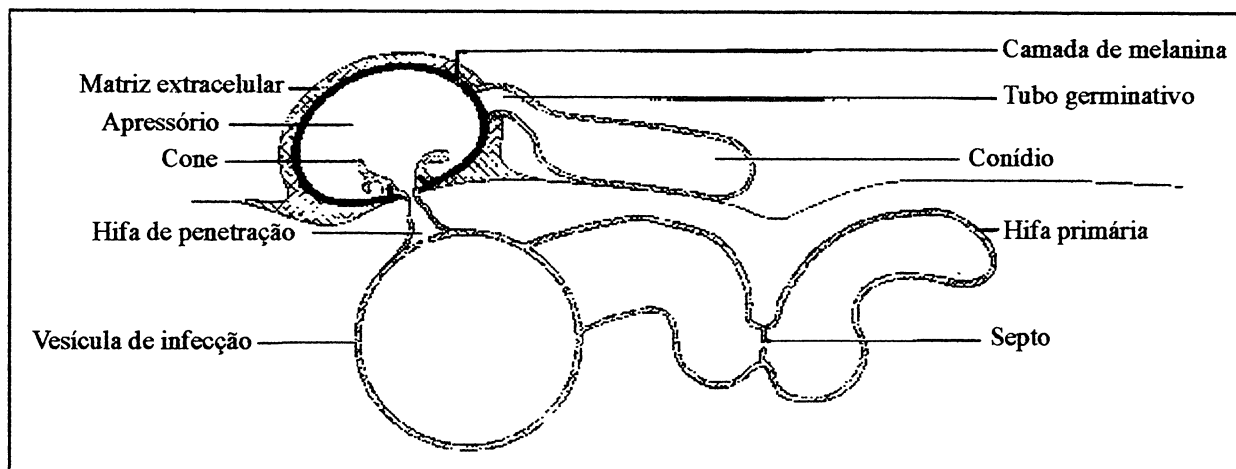


Figura 1 - Representação esquemática da formação das estruturas de infecção de *C. lindemuthianum* sobre folhas de feijão (adaptado de Mendgen & Deising, 1993)

Em publicação oficial da Sociedade Americana de Micologia, Mims (1991) tece uma série de considerações sobre o uso do microscópio eletrônico no estudo dos fungos patogênicos de plantas. O autor descreve que esporos, tubos germinativos e apressórios em superfícies de folhas são facilmente estudados através de microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, a nível de microscopia eletrônica de transmissão, o estudo de patógenos infectando folhas é complicado devido a dificuldade de encontrar, orientar e seccionar as estruturas (Mims, 1991). Estes problemas são resolvidos pelo uso de membranas artificiais (Mims & Richardson, 1989; Mims, 1991). Além de informar as características ultraestruturais da germinação, este modelo pode ser utilizado para a investigação de moléculas que atuam sobre o fungo, em sistemas independentes das interações planta-patógeno (Howard & Valent, 1996).

Nos últimos anos, vários trabalhos sobre germinação têm sido realizados sobre membranas artificiais, como a germinação de *M. grisea* sobre membrana de celofane (Bourett & Howard 1990) e *C. truncatum* sobre membrana de diálise (Van Dyke e Mims, 1991). Em ambos os casos, o método de processamento utilizado foi a criofixação. Informações sobre a germinação em membranas artificiais processadas com fixação química convencional, mais acessível, não foi encontrada. Estudos ultraestruturais em durante a germinação de *C. graminicola* sobre membranas artificiais não estão relatados na literatura. Consequentemente, torna-se importante a padronização de germinação deste fungo sobre membranas que sejam passíveis de processamento convencional para microscopia eletrônica de transmissão.

A germinação de esporos de fungos pode ser considerada como um processo de diferenciação celular de células eucarióticas (Weete, 1984). Como anteriormente exposto, a partir de uma célula são geradas outras células altamente especializadas com funções muito específicas. A dependência de nutrientes varia consideravelmente entre as diferentes espécies de fungos (Griffin, 1994). Por exemplo, *M. anisopliae* necessita de meio complexo para formar abundante número de apressórios sobre membrana de poliestireno (Leger *et al.*, 1989), enquanto *C. graminicola* germina somente em presença de água (Leite, 1992). Em muitos casos, os lipídios constituem a reserva endógena que serve como fonte de energia e de substrato para atividades de síntese (Weete, 1974; 1984). Esporos de inúmeros fungos, como de várias ferrugens, ascósporos de *Neurospora tetrasperma* e teliósporos de *Tilletia caries* (Weete, 1984), apresentam elevado conteúdo de lipídios armazenados. Depósitos de lipídios também foram demonstrados em basidiósporos de *Agaricus campestris* (Ruch & North, 1988), *Chlorophyllum molybdites*, *Oudemansiella radicata* e *Leucoagaricus naucina* (Ruch *et al.*, 1991), bem como em *C. truncatum* (Van Dyke & Mims, 1991), *C. gloeosporioides* (Kerrigan & Mims, 1993) e *C. graminicola* (Mims *et al.*, 1995). A possibilidade da utilização

dos lipídios armazenados em *C. graminicola* no ciclo do glioxilato, durante a germinação dos conídios foi levantada, em revisão de literatura sobre micosporinas (Leite & Schadeck, 1996).

A utilização de lipídios durante a germinação foi pioneiramente observada por Farkas & Ledingham (1959), estudando esporos causadores da ferrugem. Neste caso, durante a embebição e nas primeiras horas da germinação, os esporos utilizam preferencialmente ácidos graxos como substrato respiratório. Posteriormente, o consumo de lipídios durante o processo germinativo foi verificado em inúmeros fungos citados em revisões de literatura (Maxwell *et al.*, 1977; Weete, 1974; 1984). Como exemplo pode-se citar o desaparecimento dos numerosos corpos lipídicos presentes em esporos de *Acyria cinerea* (Mims, 1971), em *Puccinia recondita* (Salako, 1981) e *Gigaspora albida* (Glomales) (Maia *et al.*, 1994).

A diminuição das reservas de lipídios, em esporos *Uromyces phaseoli* germinados somente em presença de água, é atribuída não só a sua utilização como reserva energética, mas também a sua utilização no ciclo do glioxilato (Caltrider *et al.*, 1963). O ciclo do glioxilato converte lipídios em carboidratos na forma solúvel, e em cadeias de carbono intermediárias (Gottlieb & Ramachandran, 1960; Ruch *et al.*, 1991). Enzimas deste ciclo têm sido detectadas em inúmeros fungos (Gottlieb & Ramachandran, 1960; Caltrider *et al.*, 1963; Mills & Cantino, 1975; Assis & Amaral, 1976; Ruch *et al.*, 1991).

Lipídios armazenados em conídios de *C. gloeosporioides* e *C. graminicola* são consumidos durante o envelhecimento (Kerrigan & Mims, 1993; Mims *et al.*, 1995); porém, não há informação sobre a mobilização destas reservas durante a germinação neste fungos. Em *C. graminicola* o processo germinativo ocorre sem a adição de nutrientes exógenos (Leite & Nicholson, 1992) o que indica a utilização de nutrientes endógenos. Parece lógico admitir que os lipídios armazenados sejam utilizados durante a germinação.

A vacuolização do apressório durante a germinação é um fenômeno observado em diferentes espécies de fungos. Porém, ainda que as imagens dos trabalhos mostrem a presença

de vacúolos no apressório os autores não descrevem ou discutem a evolução e função dos mesmos. Em *C. graminicola* inoculado em folhas de milho suscetível e em aveia resistente observa-se vacuolização do citoplasma do apressório (Politis & Wheeler, 1973; Politis, 1976). Da mesma forma, o apressório de conídio de *C. lindemuthianum* germinado sobre folhas de feijão apresenta o citoplasma vacuolizado, após a formação da hifa de penetração (O'Connell *et al.*, 1985). Em *Puccinia arachidis*, à medida que a infecção evolui, o apressório torna-se cada vez mais vacuolizado, enquanto núcleo e citoplasma são transferidos para o interior da hifa de penetração (Mims *et al.*, 1989). Da mesma forma observou-se em conídios de *M. grisea*, germinados sobre membrana de celofane, a vacuolização progressiva do apressório, sendo que o fenômeno torna-se mais intenso à medida que ocorre a penetração (Bourett & Howard, 1990).

Em relação as mudanças morfológicas e fisiológicas no conídio durante a germinação pouca informação foi encontrada na literatura. Foi observado que basidiósporos dormentes de *Psilocybe* sp desenvolvem numerosos pequenos vacúolos durante a germinação, apresentando o restante da organização citológica semelhante a esporos dormentes (Stockes & Hess, 1970). Como está bem determinado, em conídios de *C. graminicola* ocorre intensa vacuolização do citoplasma durante o envelhecimento (Leite, 1992). A questão que surge, baseada nestes resultados, é se a vacuolização é observada também durante a germinação de *C. graminicola*.

2.4 VACÚOLOS EM FUNGOS

Vacúolos estão presentes em diferentes estruturas fúngicas, como em hifas de *C. albicans* (Gow & Gadd, 1995), de esporos de *Colletotrichum* sp (Kerrigan & Mims, 1993; Mims *et al.*, 1995) e de apressórios de *M. grisea* (Bourett & Howard, 1990). Nos últimos anos tornou-se óbvio que esta organela é altamente complexa e desempenha funções fundamentais

para a fisiologia celular dos fungos (Gow & Gadd, 1995). Vacúolos de fungos podem exercer várias funções, como lisosomal, de armazenamento de substâncias, controle da homeostase, do pH e da concentração de íons no citosol (Klionsky *et al.*, 1990; Griffin, 1994). São organelas ácidas e a H^+ -ATPase da membrana vacuolar está identificada e purificada em *S. cerevisiae*, *Saccharomyces calrsbergensis* (Klionsky *et al.*, 1990) e em *N. crassa* (Bowman & Bowman, 1982). Um importante composto armazenado em vacúolos de fungos são os polifosfatos, como em *N. crassa* (Cramer *et al.*, 1980) e em *S. cerevisiae* (Indge, 1968; Shimara *et al.*, 1996). Além de armazenar fosfato, o polifosfato tem função na retenção de aminoácidos básicos e outros cátions, participando da osmorregulação celular (Klionsky *et al.*, 1990).

Os vacúolos mais bem estudados são os de *S. cerevisiae* (Klionsky *et al.*, 1990; Takeshige *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997; Baba *et al.*, 1997) os quais apresentam fosfatase ácida (Rijn *et al.*, 1975; Linnemans *et al.*, 1977). Os mesmos são referidos como vacúolo/lisosoma (Baba *et al.*, 1997). A acidificação do vacúolo é fundamental para as suas atividades, como a manutenção do potencial eletroquímico que dirige o transporte de aminoácidos e íons através da membrana (Klionsky *et al.*, 1990; Griffin *et al.*, 1994). Mutantes de *S. cerevisiae* que não apresentam o gene *vma*, que codifica subunidades da H^+ -ATPase, apresentam acúmulo de corpos autofágicos no vacúolo (Nakamura *et al.*, 1997). Inúmeras enzimas hidrolíticas foram caracterizadas, isoladas, purificadas e estudadas a nível genético (Klionsky *et al.*, 1990). Os polifosfatos armazenados desempenham importante papel no crescimento da levedura. Shimara *et al.* (1996) demonstraram que a levedura selvagem cresce três gerações em meio deficiente de fosfato, enquanto um mutante deficiente do compartimento vacuolar, e que não armazena polifosfatos, cessa imediatamente o seu crescimento nessa condição. Na levedura selvagem, o “pool” de fosfato decresce durante este evento. Os autores sugerem que os polifosfatos são clivados por

uma endopolifosfatase dentro do vacúolo e que os vacúolos desempenham um papel crítico no metabolismo do fosfato. Abaixo está representado um esquema do vacúolo desta levedura, apontando os principais aspectos da membrana da organela e enfocando o depósito de polifosfatos.

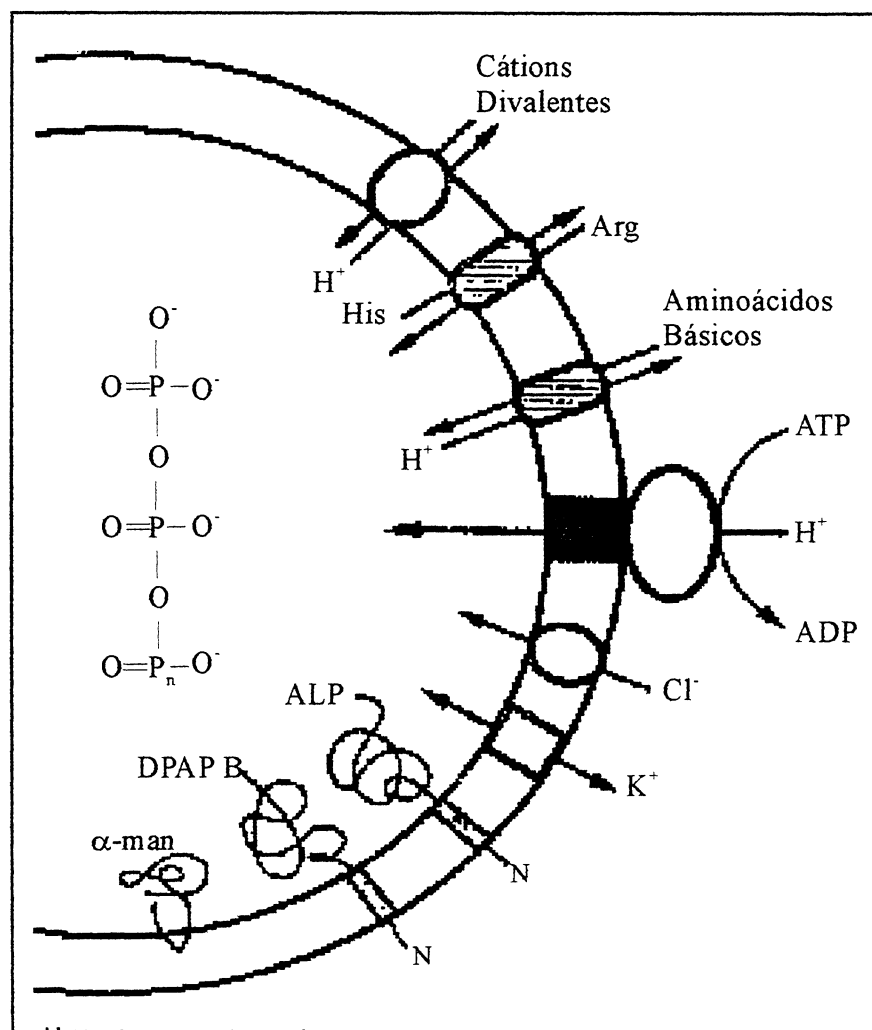


Figura 2 - Esquema representativo da membrana vacuolar de *S. cerevisiae*.

A função primária da H^+ -ATPase é bombear prótons e gerar o potencial eletroquímico para dirigir outros sistemas de transporte. As enzimas α -manosidase (α -manos), dipeptidil aminopeptidase B (DPAP B) e fosfatase alcalina (ALP) são enzimas de membrana. No lúmen do vacúolo encontram-se polifosfatos armazenados (adaptado de Klionsky *et al.*, 1990).

Os vacúolos de fungos apresentam uma variedade de enzimas hidrolíticas com função de degradação de macromoléculas (Hänssler *et al.*, 1975; Wilson *et al.*, 1980; Klionsky *et al.*, 1990; Griffin, 1994), inclusive fosfatase ácida, como em *S. rouxii* (Arnold & Garrinson, 1979), *A. flavus* (Bojovic-Cvetic & Vujicic, 1982) e *P. cubensis* (Ruch & Motta, 1987). Em hifas de *S. rolfisii* numerosos vacúolos apresentam marcação citoquímica para fosfatase ácida, e sugere-se aos mesmos, dentre outras, a participação na mobilização de reservas nutritivas (Hänssler *et al.*, 1975). A função digestiva dos vacúolos em esporos está demonstrada em *Botrytis cinerea* e *Ceratocystis ulmi*, nos quais aqueles participam de um processo denominado pelo autor como “autofagocitose de gotículas de lipídios” e na detoxificação do vermelho neutro, enquanto em *Elsinoe wisconsinensis* os vacúolos participam na digestão intracelular do glicogênio (Wilson *et al.*, 1980). Significativamente, durante a germinação de *Pythium ophanidermatum* observa-se a captação do glóbulo central de lipídio pelo vacúolo nos primeiros estágios da emergência do tubo germinativo (Ruben & Staghellini, 1978). Em vegetais os vacúolos também estão relacionados à digestão intracelular. Adquire especial importância a sua participação na germinação, como em grãos de aleurona, os quais desaparecem nos primeiros estágios da germinação, apresentando enzimas hidrolíticas, inclusive fosfatase ácida (Clarke & Laidman, 1991). A vacuolização com concomitante diminuição de lipídios durante o envelhecimento de conídios de *C. graminicola* está bem estabelecida (Leite, 1992; Mims *et al.*, 1995). É possível que os vacúolos neste fungo também desempenhem função digestiva.

O envolvimento de vacúolos em processos autofágicos tem sido reportados em leveduras (Takeshige *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1994) e células vegetais (Aubert *et al.*, 1996). A autofagia é um processo através do qual as células degradam partes de seu citoplasma

(Dunn, 1990a; Takeshige *et al.*, 1992; Houri *et al.*, 1995; Aubert *et al.*, 1996; Moriyasu & Oshumi, 1996; Yuan *et al.*, 1997). Na autofagia clássica, porções do citoplasma são seqüestradas por uma dupla membrana, formando autofagosoma, o qual funde-se então com o lisosoma, descarregando seu conteúdo no interior do mesmo (Dunn, 1990a, b; Takeshige *et al.*, 1992; Houri *et al.*, 1995; Aubert *et al.*, 1996; Moriyasu & Oshumi, 1996; Yuan *et al.*, 1997). Este tipo de autofagia tem sido referido nos últimos anos como “macroautofagia” (Yuan *et al.*, 1997). A formação do autofagosoma é afetada por inúmeros compostos, como o AMPc, representando um ponto de controle no processo (Holen *et al.*, 1996). O aumento da autofagia durante um estresse nutritivo é conhecido desde a década de 60 e representa um mecanismo de sobrevivência, uma vez que permite a digestão de porções dispensáveis do citoplasma, com conseqüente produção de moléculas essenciais à produção de energia e outras funções celulares (Jan, 1969).

A autofagia está sendo amplamente estudada em *S. cerevisiae* (Takeshige *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997), enquanto em outros fungos o assunto é pouco abordado. Foi demonstrado, no tipo selvagem da levedura, degradação extensiva de componentes citosólicos através da autofagia em condições de deficiência de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1994). O mecanismo do processo autofágico neste organismo é essencialmente similar ao observado em células animais (Baba *et al.*, 1994). Mais recentemente tem sido usada seleção genética nesta levedura para identificar mutantes defectivos na autofagia (Thumm *et al.*, 1994).

A captação de material citoplasmático diretamente pelo vacúolo de leveduras, através de projeções e invaginações da membrana vacuolar, foi observada. O termo “microautofagia” tem sido usado para denominar este tipo de captação. Em *Pichia pastoris* a degradação de peroxissomas pode ocorrer tanto em processo análogo a macroautofagia, em meio etanólico, ou a microautofagia, em meio com glucose (Tuttle & Dunn, 1995). Sugere-se que a

subunidade alfa da fosfofrutoquinase modula a regulação da microautofagia induzida por glucose (Yuan *et al.*, 1997). Na célula *pep-4*, mutante de levedura, verificou-se a degradação de peroxissomas através de microautofagia, quando células crescidas em meio sem glucose passavam a crescer em meio com glucose (Chiang *et al.*, 1996)

A autofagia foi sugerida em conídios de *Colletotrichum sp.* Em conídios velhos de *C. graminicola* observa-se a presença de vacúolos autofágicos, apresentando uma dupla membrana e contendo organelas citoplasmáticas típicas (Mims *et al.*, 1995). Em conídios de *C. gloeosporioides*, Kerrigan & Mims (1993) sugerem a captação direta de lipídios pelo vacúolo, embora o evento não tenha sido diretamente visualizado. Uma vez que este processo já foi sugerido em *B. cinerea* e *C. ulmi*, (Wilson *et al.*, 1980) e em *P. ophanidermatum* (Ruben & Staghellini, 1978) o mesmo poderia acontecer em conídios de *C. graminicola*.

2.5 ENDOCITOSE EM FUNGOS

Em fungos, alguns estudos abordam a endocitose. Por exemplo, em *B. cinerea*, análises ultraestruturais demonstram a formação de numerosas invaginações na membrana plasmática, sugerindo processo endocítico (Wilson *et al.*, 1980). Em *S. cerevisiae* o processo tem sido mais estudado. Endocitose mediada por receptor foi demonstrada na internalização do ferormônio fator- α , o qual liga-se ao seu receptor, sendo internalizado e dirigido ao vacúolo para degradação (Chvatchko *et al.*, 1986; Dulic & Riezman, 1989; Raths *et al.*, 1993). Da mesma forma, nesta levedura a uracil permease, um transportador de membrana, é endocitado e degradado no vacúolo (Volland *et al.*, 1994). Semelhantemente, quando as células passam de meio sem glucose para meio com glucose, o transportador para galactose (Gal2p) e a ATPase, ambas proteínas da membrana plasmática, são degradadas no vacúolo, dependentes da via endocítica (Chiang *et al.*, 1996).

2.6 VACUOLIZAÇÃO EM CONÍDIOS DE *C. graminicola* E CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

A vacuolização durante o envelhecimento de conídios de *C. graminicola* está bem determinada (Leite, 1992; Mims *et al.*, 1995). A deposição intracelular do vermelho neutro em pequenas e numerosas vesículas em conídios jovens e em vesículas cada vez maiores em conídios velhos (Leite, 1992) indicam que os vacúolos também relacionam-se com o exterior da célula. O vermelho neutro é um corante vital classicamente conhecido como sendo captado e transferido para lisosomas em inúmeros tipos celulares (Allison & Young, 1969), sendo também utilizado no estudo da dinâmica da transferência de substâncias estranhas para o vacúolo em fungos (Wilson *et al.*, 1980). Embora o mecanismo de captação do corante em células animais ainda não esteja totalmente esclarecido (Naka *et al.*, 1995), aceita-se que o mesmo penetra nas células por difusão passiva através da membrana plasmática (Lowe *et al.*, 1995) e é concentrado no lisosoma (Seglen, 1983). Assim, a retenção do corante nos lisosomas é vastamente utilizada como parâmetro para o estudo da integridade de membrana deste compartimento em variados tipos celulares (Lindsay *et al.*, 1995; Lowe *et al.*, 1995; Repetto & Repetto, 1995; Svedsen & Weeks, 1995).

A presença do vermelho neutro em vesículas no interior do vacúolos de conídios não germinados, após 15 minutos de incubação, está demonstrada (Leite, 1992). Torna-se interessante analisar os detalhes da captação em tempos anteriores a este e verificar se, após a germinação, os conídios mantêm esta capacidade.

2.7 MICOSPORINAS

2.7.1 *Características gerais das micosporinas em fungos*

Micosporinas são compostos solúveis em água que absorvem radiação UV na faixa de 310-313 nm e são produzidos por inúmeras espécies de fungos, como os fungos imperfeitos, basidiomicetos e ascomicetos (Arpin *et al.*, 1979; Arpin & Bouillant, 1988; Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Leite & Nicholson, 1992). Também foram identificados e caracterizados estruturalmente em organismos marinhos como na alga *Chondrus yeondi* (Tsuji *et al.*, 1978), no zoantídeo *Palythoa tuberculosa* (Ito & Hirata., 1977), e em peixes (Chioccaro *et al.*, 1980).

Estes metabólitos são isolados a partir de culturas em estágio de esporulação desde a década de 60, sendo referidos nesta época como compostos “P310” (Leach, 1965; Trione & Leach, 1966) A primeira micosporina a ter sua estrutura química elucidada foi purificada de *Stereum hirsutum* por Favre-Bonvin *et al.*, (1976). Designadas genericamente pelo termo "micosporinas", apresentam uma ciclohexanona substituída, ligada a um aminoácido ou a um de seus derivados, conforme Tabela 1 (pg. 25) (Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Bouillant *et al.*, 1981; Fayret & Vito, 1981; Young & Patterson, 1982; Pittet *et al.*, 1983a; Bernillon *et al.*, 1984; Buscot & Bernillon, 1991; Leite & Nicholson, 1992). As normicosporinas, que absorvem em 320 nm, diferem das micosporinas pela substituição do grupamento metóxi ligado ao anel ciclohexanona por hidrogênio (Bernillon *et al.*, 1984).

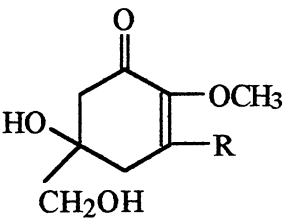
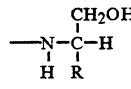
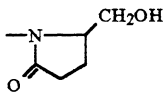
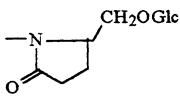
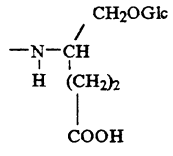
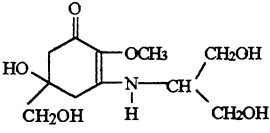
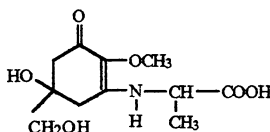
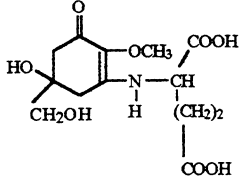
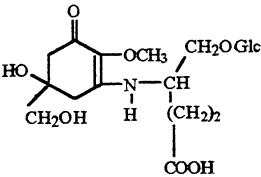
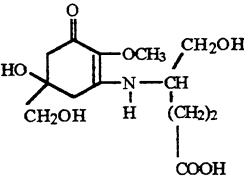
Anel ciclohexanona substituído	Radicais (R) ligados ao anel ciclohexanona presentes em micosporinas
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aminoácido 2. Aminoácido com carboxila reduzida a álcool <div style="text-align: center;">  </div> 3. Forma cíclica do ácido glutâmico reduzido <div style="text-align: center;">  </div> 4. Derivados glucosil de aminoácido <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>

Tabela 1 - Estrutura química geral de micosporinas.

Uma série de micosporinas foram caracterizadas estruturalmente (Tabela 2). Como pode-se observar a maioria das micosporinas purificadas de fungos apresentam o radical ácido glutâmico ou um de seus derivados. O mesmo fungo pode apresentar mais de uma forma de micosporina. Este fenômeno é verificado em *Gnomonia leptostyla* que apresenta micosporina-ácido glutâmico reduzido e micosporina-ácido piroglutâmico reduzido (Fayret & Vito, 1981) e em *Morchella esculenta* que apresenta micosporina-ácido glutâmico e micosporina-glutamina (Buscot & Bernillon, 1991).

Micosporina	Fungo	Referência
<p>Micosporina-serinol</p> 	<i>Stereum hirsutum</i>	Favre-Bonvin <i>et al.</i> (1976) referido como micosporina serinol por Bernillon <i>et al.</i> , (1984)
<p>Micosporina-alanina</p> 	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Leite & Nicholson (1992)
<p>Micosporina-ácido glutâmico</p> 	<i>Glomerella cingulata</i> <i>Helvellea leucomellanea</i> <i>Morchella esculenta</i>	Young & Patterson (1982) Bernillon <i>et al.</i> (1984) Buscot & Bernillon (1991)
<p>Micosporina-ácido glutâmico com derivados de glucosil</p> 	<i>Trichotecium roseum</i>	Pittet <i>et al.</i> (1983a)
<p>Micosporina-ácido glutâmico reduzido</p> 	<i>Trichotecium roseum</i> <i>Gnomonia leptostyla</i>	Pittet <i>et al.</i> (1983a) Fayret & Vito (1981)

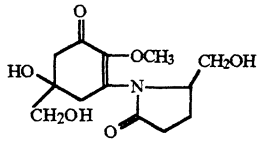
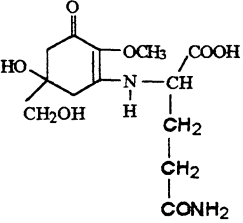
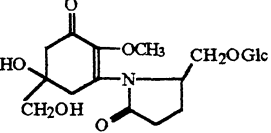
<p>Micosporina-ácido piroglutâmico reduzido</p> 	<p><i>Gnomonia leptostyla</i></p> <p><i>Botrytis cinerea</i></p> <p><i>Trichotecium roseum</i></p>	<p>Fayret & Vito (1981)</p> <p>Arpin <i>et al.</i> (1977)</p> <p>Pittet <i>et al.</i> (1983a)</p>
<p>Micosporina-glutamina</p> 	<p><i>Pyronema omphalodes</i></p>	<p>Bernillon <i>et al.</i> (1984)</p>
<p>Micosporina-ácido piroglutâmico com derivado de glucose</p> 	<p><i>Cladosporium herbarium</i></p> <p><i>Sptoria nodorum</i></p> <p><i>Ascochyta pisi</i></p>	<p>Bouillant <i>et al.</i> (1981)</p>

Tabela 2 - Estrutura química de micosporinas em fungos

As primeiras micosporinas estudadas foram identificadas somente com base no seu espectro de absorção no UV e chamadas de compostos P310 (Trione *et al.*, 1966; Sproston & Setlow, 1968; Trione & Leach, 1969). Por exemplo, Trione & Leach (1969) isolaram compostos P310, através de vários processo cromatográficos, cujos espectros de absorção de ultravioleta são semelhantes ao de micosporinas posteriormente purificadas (Pittet *et al.*, 1983b; Leite & Nicholson, 1992). O objetivo principal das investigações era isolar substâncias esporogênicas sintetizadas em presença de luz em fungos cuja esporulação era foto dependente. Assim, o composto P310 induziu a formação de picnidias em *Aschochyta pisi* e a formação de conídios e peritécios em *Pleospora herbarum* cultivadas no escuro (Trione *et al.*, 1966; Trione & Leach, 1969). Várias investigações sugeriram que as

micosporinas estão relacionadas à reprodução sexuada e assexuada em fungos (Dehorter 1976; Pittet *et al.*, 1983c). Em *Nectria galligena*, a micosporina adicionada a culturas no escuro induz a formação de peritécios férteis (Dehorter, 1976). Para este autor, as micosporinas constituem-se em um intermediário bioquímico entre a luz e a resposta biológica: a morfogênese sexual (Dehorter *et al.*, 1980). Posteriormente, Dehorter & Lacoste (1989) demonstraram que o desenvolvimento peritecial induzido pela luz e induzido pela micosporina no escuro apresentavam alta relação entre NADP⁺-isocitrato desidrogenase/isocitrato liase, sendo que a micosporina inibia a isocitrato liase *in vivo* (Dehorter & Lacoste, 1989). Em *G. leptostyla* a quantidade de micosporina é alta no talo conidiogênico e baixa no micélio vegetativo, sendo que a micosporina acumula-se tanto no microconídio como no macroconídio (Fayret & Vito, 1981). Estudos em *Ascochyta fabae* demonstraram a correlação entre conidiogênese e produção de micosporina (Pittet *et al.*, 1983c).

Outra função sugerida refere-se a proteção contra radiação ultravioleta. Este papel foi atribuído ao composto "P 310" presente na mucilagem de conídios de *Glomerella cingulata* (Brook; 1981), estágio sexual de *C. gloesporioides*. Posteriormente, a micosporina isolada a partir dos extratos cedidos por Brook (1981), foi caracterizada estruturalmente por Young & Patterson (1982) como micosporina-ácido glutâmico.

Uma nova perspectiva surgiu em função do isolamento e caracterização da micosporina-alanina (Leite & Nicholson, 1992). Neste caso, observa-se a inibição da germinação em conídios jovens e estimulação da germinação em conídios velhos (Leite, 1992).

O conhecimento relativo às vias biossintéticas, para a produção de micosporinas, é ainda insuficiente. Entretanto, a participação da via do ácido shiquímico na síntese do anel ciclohexanona foi sugerida na biossíntese de micosporina-glutaminol em *Trichothecium*

roseum (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Por outro lado, Bernillon *et al.*, (1984) isolaram do fungo *Pyronema omphalodes*, os seguintes compostos: normicosporina glutamina, micosporina-glutamina e uma forma de micosporina glicosilada. Estes resultados levaram os autores a sugerir que existe uma via biossintética comum para a síntese desses compostos e que evoluiu no sentido de aumentar a estabilidade das moléculas geradas.

2.7.2 *Micosporina-alanina em C. graminicola*

Conídios de *C. graminicola* apresentam o fenômeno de auto-inibição de germinação em condições de superpopulação (Leite & Nicholson, 1992). Os autores inicialmente verificaram que a mucilagem bruta extraída dos conídios exercia efeito de inibição da germinação. Após purificação, observaram que este efeito acontecia nas frações que exibiam absorção em 310 nm. Análises de espectrometria de massa indicaram que o composto correspondia a micosporina-alanina, o qual apresentou efeito de auto-inibidor de germinação em conídios jovens (Leite & Nicholson, 1992). Embora a natureza química dos auto-inibidores de germinação não seja conhecida em muitas espécies, os auto-inibidores conhecidos apresentam grande variedade no que refere-se a estrutura química, como referido por Moore-Landecker (1996), citando a micosporina-alanina (Leite & Nicholson, 1992) e o composto volátil acetato (Leite, 1992) como exemplo de auto-inibidores, dentre vários outros. A concentração da micosporina-alanina na mucilagem é 4 de mM e nenhuma absorção em 310 nm foi detectada em células lavadas e sonicadas. Os autores sugerem que a micosporina localiza-se extracelularmente, na mucilagem (Leite & Nicholson, 1992).

A maioria dos processos de extração de micosporinas empregam etanol ou metanol (Trione & Leach, 1969; Tsujino *et al.*, 1978; Bouillant *et al.*, 1981; Young & Patterson, 1982; Pitte *et al.*, 1983a; Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Buscot & Bernillon, 1991). Este tipo de metodologia extrai o composto da célula inteira. A extração somente da mucilagem foi

efetuada por Leite & Nicholson (1992) em conídios de *C. graminicola* e por Young & Patterson (1982) em conídios de *G. cingulata*, estágio sexual de *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992). Durante o isolamento e purificação do composto P310, que apresentava efeito auto-inibidor de germinação, somente água foi usada como solvente. Temia-se que outros solventes acabassem mascarando os resultados dos bioensaios (Leite, 1997, comunicação pessoal). Nos processos de isolamento e purificação de produtos naturais, a otimização das condições de extração tem sido enfatizada, no sentido de maximizar a retirada do composto desejado e propositadamente prevenir a solubilização de outros componentes celulares. Uma vez determinada a estrutura do composto como sendo uma micosporina passa a ser possível aplicar processos extrativos com maior rendimento, utilizando solventes empregados na extração de outras micosporinas.

3 OBJETIVOS

3.1.1 *Objetivos gerais*

- a. Caracterização da atividade da fosfatase ácida em *C. graminicola* através de métodos espectrofotométricos e citoquímicos ultraestruturais.
- b. Determinação da relação entre vacúolos e mobilização de lipídios em conídios não germinados de *C. graminicola*.
- c. Extração e isolamento de micosporina (s) em conídios não germinados de *C. graminicola* e avaliação preliminar da sua estrutura.

3.1.2 *Objetivos específicos*

- a. Caracterização espectrofotométrica da atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.
- b. Caracterização citoquímica ultraestrutural da atividade da fosfatase ácida em conídios não germinados.
- c. Caracterização da mobilização de lipídios durante a germinação.
- d. Caracterização ultraestrutural da germinação de conídios de *C. graminicola*.
- e. Investigação da mobilização intravacuolar de lipídios.
- f. Monitoramento da atividade da fosfatase ácida através de métodos citoquímico ultraestrutural durante a germinação.
- g. Aprofundamento do estudo da dinâmica vacuolar analisando a captação do vermelho neutro.

- h. Monitoramento da atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios de diferentes idades.
- i. Otimização dos procedimentos de extração e isolamento de micosporina.
- j. Caracterização preliminar da estrutura da fração micosporina através de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa de “electrospray ionization” (ESI-MS) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).
- k. Investigação dos efeitos biológicos da fração micosporina sobre a germinação em *C. graminicola*.



Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 CRESCIMENTO DO FUNGO

Colletotrichum graminicola (teleomórfico = *Glomerella graminicola* - Politis) (Ces.) Wils., isolado de milho CgM2, foi cedido ao Prof. Dr. Breno Leite pelo Dr. Ralph Nicholson (Host Parasite Interaction Laboratory, Purdue University, West Lafayette, IN, USA). O fungo foi cultivado em meio de ágar e aveia (Quaker), a temperatura de 20-22° C, sob condições de iluminação fluorescente contínua. Nestas condições ocorre a formação de conídios.

4.2 ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA NO HOMOGENATO DE CONÍDIOS NÃO GERMINADOS

4.2.1 Ensaio espectrofotométrico

A atividade da fosfatase foi determinada segundo Galabova *et al.* (1993), baseado na hidrólise do p-nitrofenilfosfato de sódio (pNPP). Para a obtenção do homogenato, a suspensão de conídios (Absorbância em 570 nm = 0,4-0,8; diluição da leitura = 100 x) foi inicialmente lavada 3 vezes em água, através de centrifugação (1000 x g, 5 minutos). A seguir foi colocada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 e agitada juntamente com microesferas de vidro de 500-1000 µm, em vórtex durante um minuto e imediatamente a seguir colocada em banho de gelo pelo mesmo período de tempo. Este procedimento foi repetido oito vezes. Após o rompimento, a suspensão contendo os conídios fragmentados, foi centrifugada por 5 minutos a 1000 x g e 4° C (González *et al.*, 1993). Nestas condições obtinha-se 90-100 % de

rompimento das células. O sobrenadante foi denominado homogenato e continha 50-100 µg/mL de proteína. O sistema de incubação, no volume final de 325 µl, continha 50 mM tampão acetato de sódio pH 5,5, pNPP 3 mM e 5-10 µg de proteína do homogenato. A reação foi iniciada pela adição do substrato e transcorreu a 37° C. Após 10 minutos foi interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 0,2 M e a absorbância do p-nitrofenol liberado foi determinada a 410 nm ($E_{410} = 1,84 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por µg de proteína por minuto. A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

4.2.2 Determinação das condições ótimas de atividade

O pH ótimo para a atividade da fosfatase ácida foi determinado nas condições descritas no item 4.2.1 variando o pH de 4,0 à 6,5, em tampão acetato (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993). O sistema continha pNPP 3 mM e 5-10 µg de proteína do homogenato.

Com a finalidade de determinar a constante de Michaelis para a fosfatase ácida, a enzima foi ensaiada nas condições descritas no item 4.2.1 variando as concentrações de substrato de 0, a 6,0 mM (final). O sistema continha 5-10 µg de proteína do homogenato e a atividade foi ensaiada no pH 5,5.

Na análise do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, o ensaio foi realizado de acordo com o descrito no item 4.2.1 nas temperaturas de 20 a 80° C. O sistema continha pNPP 3 mM, 5-10 µg de proteína do homogenato e a atividade foi ensaiada no pH 5,5.

Na determinação do pH ótimo, do efeito da temperatura e da concentração do substrato a atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por µg de proteína por minuto.

O efeito do tempo sobre a atividade da fosfatase ácida foi realizado de acordo com o descrito no item 4.2.1, variando o tempo de incubação de 5 a 90 minutos. O sistema continha pNPP 3 mM, 5-10 µg de proteína do homogenato e a atividade foi ensaiada no pH 5,5. A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por µg de proteína.

Efeito da concentração de proteína sobre a atividade da fosfatase ácida foi determinado de acordo com o item 4.2.1 variando as concentrações de proteína no ensaio: de 0,5 - 21 µg no ensaio. O sistema continha pNPP 3 mM e a atividade foi ensaiada no pH 5,5. A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por minuto.

4.3 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA EM CONÍDIOS INTACTOS E PERMEABILIZADOS COM TRITON X-100

Na determinação da concentração ótima do detergente, a suspensão de conídios com 15 dias de idade ($Abs_{570nm} = 0,8$) foi incubada com Triton X-100 em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%) durante 30 minutos a 37° C. Após isto foi ensaiada a atividade enzimática de acordo com o item “ensaio enzimático” descrito abaixo.

Na determinação da temperatura ótima de permeabilização, a suspensão de conídios ($Abs_{570nm} = 0,8$) foi incubada com o detergente, na concentração 0,1%, em diferentes temperaturas (0, 20, 40, 60 e 80° C) durante 30 minutos. Após isto foi determinada a atividade enzimática de acordo o item “ensaio enzimático” descrito abaixo.

Ensaio enzimático: os conídios (15 dias de idade), retirados diretamente da cultura, foram lavados através de centrifugação (1000 x g, 5 minutos) uma vez em água e três vezes em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e ressuspensos no mesmo tampão. Na determinação da atividade enzimática total em conídios permeabilizados, a suspensão de células ($Abs_{570nm} = 0,7 - 0,8$) foi tratada com Triton X-100 0,1 % durante 30 minutos, a 37° C.

Ao volume de 300 μl desta suspensão foi adicionado pNPP 3 mM. Após 10 minutos, a 37° C, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 0,2 M, seguida de centrifugação a 1000 x g durante 3 minutos (Galabova, 1993). A absorvância do p-nitrofenol liberado foi lida no sobrenadante em 410 nm ($E_{410} = 1.84 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por minuto por absorvância da suspensão de conídios. Na determinação da atividade extracelular, em conídios intactos, omitiu-se a presença de Triton X-100. As demais condições foram idênticas às condições da célula permeabilizada.

Para eliminar a possibilidade do detergente estar afetando a enzima, foi testada a atividade enzimática no homogenato, de acordo com o item 4.2.1, na ausência e presença Triton X-100 0,1%. Os resultados indicaram que nesta concentração o detergente não afeta a atividade enzimática (resultados não mostrados).

4.4 ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA NO HOMOGENATO DE CONÍDIOS GERMINADOS

A suspensão de conídios em água, com 14 dias de idade, na concentração de 10^3 conídios/mL foi incubada à 20-22° C, sob iluminação fluorescente contínua em frasco forrado com microesferas de vidro de 500-1000 μm . O volume aplicado da suspensão era suficiente para formar uma coluna de 1 cm sobre as microesferas. Nestas condições, os conídios sedimentavam sobre as microesferas de vidro, aderiam e germinavam sobre as mesmas. Após 16 horas de germinação, os conídios não germinados foram separados por filtração das microesferas através de tecido de *nylon*, observado através de microscopia de luz. A seguir as microesferas de vidro, contendo somente os conídios germinados aderidos, foram colocadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 e agitadas em vórtex durante um minuto e colocada em banho de gelo pelo mesmo período de tempo. Este procedimento foi repetido

oito vezes. Após o rompimento foi centrifugada por 5 minutos a 1000 x g, a 4° C. O sobrenadante foi denominado homogenato e a atividade enzimática foi determinada nas condições ótimas, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1.

4.5 ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA NO HOMOGENATO DE CONÍDIOS DE DIFERENTES IDADES

A atividade enzimática foi realizado de acordo com o descrito no item 4.2.1, com conídios de culturas de diferentes idades: 5, 15, 25, 35, 45, 55 e 65 dias, mesmas idades utilizadas por Leite (1992) no estudo da vacuolização durante o envelhecimento.

4.6 CITOQUÍMICA PARA LIPÍDIOS

Para a obtenção dos conídios germinados, os mesmos (15 dias de idade) foram lavados em H₂O, através de centrifugação (1000 x g, 5 minutos). A suspensão (1000 conídios/mL) foi incubada à 20-22° C sob iluminação fluorescente contínua, em béquer forrado com lâminas de vidro pelo período de 16 horas. A altura da coluna da suspensão de conídios foi de 1 cm. Para a obtenção das lâminas contendo conídios não germinados, 50 µl da suspensão de conídios era depositada sobre a lâmina. Após 15 minutos os mesmos aderiam, a água era retirada com papel filtro e a preparação submetida à fixação.

Os conídios germinados e não germinados foram fixados em solução de Baker (formol 4% em cloreto de cálcio 2%) pelo período de 25 minutos, lavados em água destilada e submetidos à solução hidroalcoólica de Sudan III durante 15 minutos. A solução hidroalcoólica consistia em 60% de solução saturada de Sudan III em álcool isopropílico (Culling, 1983). Foram então novamente lavados em água destilada e montados em glicerina. Após, foram fotografados em microscópio óptico no aumento total de 1.379 x (Culling, 1983).

4.7 CAPTAÇÃO VACUOLAR DE LIPÍDIOS ANALISADAS EM MICROSCOPIA DE LUZ

Os conídios germinados e não germinados, obtidos de acordo com o item 4.6., foram fixados em formol 4% pelo período de 25 minutos, e as lâminas contendo os mesmos foram lavadas em água destilada e submetidos à solução hidroalcoólica de Sudan III durante 15 minutos. A solução hidroalcoólica consistia em 60 mL da solução saturada de Sudan III em álcool isopropílico e 40 mL da água (Culling, 1983). Subseqüentemente, as preparações foram lavadas com água destilada, corados durante 15 minutos em uma solução que continha verde rápido 0,004% e ácido acético 0,04%, lavadas em água destilada e montadas em glicerina. As preparações foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss Axiophoto na ampliação de 558 x.

4.8 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (M. E. T.)

A suspensão de conídios lavados em água (10^3 conídios/mL), com 14 dias de idade, foi aplicada sobre membranas de celofane de composição celulósica (Votorantin). Após 16 horas de germinação foi submetido ao processamento para microscopia eletrônica de transmissão. Conídios não germinados, retirados diretamente da cultura, e germinados sobre membrana de celofane foram fixados na mistura de Karnovski (tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2; glutaraldeído 2,0%; p-formaldeído 4,0%; CaCl_2 5,0 mM), pelo período de duas horas. A seguir foram lavados três vezes no mesmo tampão, fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 contendo CaCl_2 5,0 mM e ferrocianeto de potássio 0,8%, pelo período de 1 hora. Subseqüentemente, foram lavados três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após isto, foram desidratados em série crescente

de concentrações de soluções aquosas de acetona (15 minutos em cada solução, ou 30 minutos - “desidratação lenta” - para remoção dos lipídios), infiltrados, emblocados em Spurr e submetidos a ultramicrotomia. Os cortes foram posteriormente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Buchi & Souza, 1992).

4.9 CITOQUÍMICA PARA FOSFATASE ÁCIDA

A suspensão de conídios lavados em água (10^3 conídios/mL), com 14 dias de idade, foi aplicada sobre membranas de celofane. Após 16 horas de germinação foi submetido ao processamento citoquímico para fosfatase ácida.

A reação citoquímica para fosfatase ácida foi realizada de acordo com Farbiarz *et al.* (1990), com modificações. Conídios germinados e não germinados retirados diretamente da cultura foram pré-fixados em glutaraldeído 1,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 durante 30 minutos. Após, foram lavados três vezes no mesmo tampão contendo sacarose 5%. Em seguida foram lavados no tampão Tris-maleato 0,1 M, pH 5,5 contendo sacarose 5%. Procedeu-se então a incubação durante 1 hora, a 37° C. O meio de incubação continha β -glicerofosfato de sódio de sódio 2,0 mM e cloreto de cério 2,0 mM no tampão Tris-maleato 0,1 M, pH 5,5 contendo sacarose 5%. Os controles consistiram de conídios incubados nas mesmas condições na ausência do substrato. Após a incubação, os conídios foram lavados no tampão em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 contendo sacarose 5%. Após isto foram processados para microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com o item 4.8, e observados sem contrastação. A deposição do produto da reação citoquímica, fosfato de cério, foi usado como parâmetro para a localização da atividade da fosfatase ácida.

4.10 EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO SOBRE A FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS

Adicionou-se suficiente fluoreto de sódio, para atingir as concentrações desejadas no ensaio, à suspensão de conídios ($Abs_{570nm} = 0,1$). Após interagir por 30 minutos, com agitação suave, foi retirado 10 mL desta suspensão e o referido volume adicionado sobre um fragmento de membrana de celofane de $1,5 \text{ cm}^2$, previamente colocada no fundo de uma cuba de plástico. A altura da coluna formada pela suspensão sobre a membrana foi igual a 1 cm. Esta é a condição ideal para obter máxima germinação dos conídios, que se depositam sobre a membrana, em uma densidade que permite fácil contagem. Os conídios assim preparados foram incubados durante 16 horas, a 20°C sob iluminação fluorescente contínua. Após isto, foram contados os apressórios em 20 campos microscópicos. O controle, incubado somente em presença de água, correspondeu ao 100% de germinação.

Com o objetivo de verificar o efeito do fosfato sobre a inibição do fluoreto na formação de apressórios, os conídios foram incubados com fluoreto em condições idênticas as anteriores, acrescidas de KH_2PO_4 5 mM. A concentração de fosfato foi previamente determinada através da análise da formação de apressórios em diferentes concentrações de fosfato adicionado ao meio. Nesta concentração, 5 mM, o fosfato não afeta a germinação. As condições de germinação foram idênticas às descritas no item anterior.

A viabilidade celular das suspensões de células utilizadas nos experimentos anteriores foi verificada. A suspensão de conídios foi incubada com vermelho neutro 0,1% durante 15 minutos. Após isto foram contadas 100 células ao microscópio óptico. Foram consideradas células viáveis aquelas que apresentaram captação do corante de modo idêntico as células retiradas diretamente da cultura, isto é, compartimentalizando o corante em vacúolos, e inviáveis as que não apresentaram esta capacidade (Leite, 1992).

4.11 CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Para o estudo dos vacúolos no conídio não germinado vivo, utilizaram-se conídios com 25 dias, uma vez que nesta idade apresentam vacúolos maiores, facilitando a visualização dos fenômenos. A suspensão de conídios ($Abs_{570nm} = 0,8$) foi colocada sobre lâmina de vidro e coberta com lamínula. Após 15 minutos, quando os conídios já haviam sedimentado sobre a lâmina, foram levados ao microscópio e focalizados. A seguir foi trocada a água da preparação pelo vermelho neutro 0,05% em água, através da capilaridade, com o auxílio de papel filtro. Imediatamente, os conídios foram fotografados com intervalo de poucos segundos, em fotomicroscópio Zeiss Axiophoto na ampliação de 558 x.

Foram também analisados conídios germinados. Os conídios de 15 dias foram lavados e 100 μ l da suspensão em água (1000 conídios/mL) foi colocada sobre lamínulas e incubada 22° C sob iluminação fluorescente contínua em condições de 100% de umidade. As lamínulas contendo os conídios germinados foram submetidas à solução de vermelho neutro 0,05% durante 5 minutos e fotografadas na ampliação total de 558 x em fotomicroscópio Zeiss Axiophoto.

4.12 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO MICOSPORINA

A extração procedeu-se conforme descrito na literatura, com modificações (Bouillant *et al.*, 1981; Young e Patterson, 1982). O esquema geral do método padronizado encontra-se na figura 3. Conídios (14-15 dias de idade) coletados de 5 placas, cultivadas na temperatura de 22-28° C, foram colocados em 10 mL de metanol ($Absorbância$ em 570 nm = 0,5-0,8; diluição da leitura = 400 x) agitados e centrifugados (1000 x g, 5 min.). O sobrenadante foi rotoevaporado até a secagem. O resíduo foi extraído com 1 mL de acetona 100 %, 3 vezes,

seguido de extração com 1 mL de acetona:água (8:2, v/v) e evaporado para remoção da acetona, resultando em uma fração aquosa final. A fração aquosa final da extração metanólica foi submetida à cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50 seguida de cromatografia de exclusão em Sephacryl S-200.

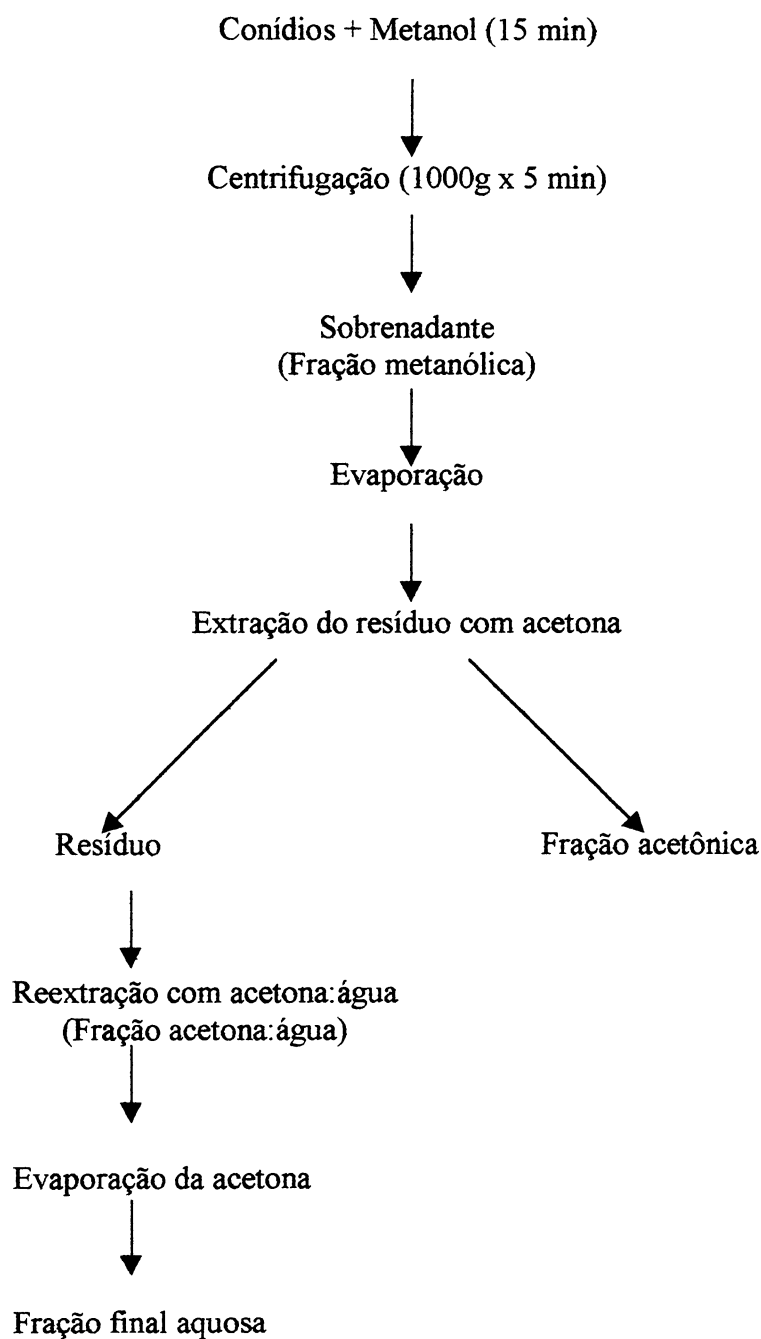


Figura 3 - Extração metanólica

4.12.1 Cromatografia de troca iônica

O fracionamento foi realizado em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A-50 (Sigma), em batelada. Um volume de resina e três volumes da fração aquosa final da extração metanólica ($Abs_{310nm} = 0,250$; diluição para leitura: 1:10) foram agitadas suavemente durante 2 minutos e colocadas em seringa de 10 mL com tampa interna de fibra de vidro e tampa de plástico na saída externa. Pela remoção desta tampa controlou-se a saída dos eluentes. Inicialmente foi removido todo o material não ligado. Seguiu-se então a lavagem com cinco vezes o volume de água. Após isto procedeu-se a eluição com NaCl 1,5 mM em 8-10 etapas, sendo que o volume utilizado do eluente em cada etapa foi igual ao volume da amostra aplicada.

4.12.2 Cromatografia de gel permeação

As frações obtidas com DEAE-Sephadex A-50 foram rotoevaporadas, ressuspensas em água ultra-pura, preparada pelo sistema Milli-Q, e submetidas à cromatografia em Sephacryl S-200 em coluna de 30 x 1,6 cm eluída com água em fluxo de 1 mL/min. Alíquotas de cada fração com perfil de absorção de micospóridas (200 - 500 nm) foram testadas para verificar a presença de cloreto com o teste do nitrato de prata, descrito a seguir. As frações que não apresentavam cloreto foram coletadas em um único frasco e liofilizadas, para posterior uso na caracterização química e ensaios biológicos.

Para a detecção do cloreto, alíquotas de 50 μ l de cada fração, com perfil de absorção de micospórida, eluída da coluna de Sephacryl S-200 eram adicionadas à 50 μ l de 0,1M $AgNO_3$ em tubo de vidro de 7 mm de diâmetro. Em presença de cloreto forma-se um precipitado branco leitoso. A observação da reação foi efetuada próximo à lâmpada fluorescente com fundo preto e com o auxílio de lupa. Nestas condições, mesmo uma leve turvação era

observada. Somente as amostras totalmente transparentes, livres de cloreto, eram coletadas. As frações contendo cloreto foram rotoevaporadas e recromatografadas em Sephacryl S-200 para remoção do NaCl.

4.12.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A fração micospolina, assim denominada devido ao perfil de absorção (200 – 500 nm) característico desta classe de compostos, foi submetida à análises de HPLC para a determinação do grau de pureza. As análises foram realizadas em equipamento marca Shimadzu, série A 10, com detector de UV (ultra violeta) e IR (índice de refração). Foi utilizada a coluna C-18 (octadecil) marca Shimadzu, modelo CLC-ODS de 150 mm de comprimento e poro de 5 µm. Como solvente foi utilizado acetonitrila 4% em água Milli-Q, num tempo de corrida de 25 minutos a um fluxo de 1mL/min.

4.12.4 Cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS)

A solução aquosa da fração micospolina foi rotoevaporada, e 3 mg da mesma foi diluída em solução contendo NaNO₃ 0,1 M e NaN₃ 0,02 % e filtrado em membrana Millipore de 0,2 µm. Em seguida, 500 µl da solução foi injetada no cromatógrafo com fluxo de 0,6 mL/min, pressão 870 psi, na temperatura de 20-22° C. Foram usadas 4 colunas de gel permeação: Ultrahydrogel 120, 250, 500 e 2000. O aparelho usado foi o cromatógrafo líquido modelo Waters 2410 com um detector de índice de refração diferencial (RI) modelo Waters e um detector de difusão de luz em multiângulos (18 ângulos), modelo Dawn DSP-Wyatt Technology, acoplados em série. Os detectores de índice de refração e difusão de luz foram monitorados pelo programa ASTRA- 4.70.070.

4.13 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FRAÇÃO MICOSPORINA

4.13.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A amostra (5,1 mg) foi liofilizada três vezes em óxido de deutério. Foram efetuadas análises mono e bidimensionais no espectrômetro BRUKER, série AVANCE, modelo DRX 400, “probe widebore”, de 5 mm de diâmetro em óxido de deutério, à temperatura de 30° C. Utilizou-se a acetona como padrão interno, com pico δ 2,224 para ^1H -RMN e δ 30,2 para ^{13}C -RMN (Me_4Si , $\delta = 0$).

Nas análises de ^1H -RMN foi empregada uma seqüência de um pulso a 30°, seguido de programa de pulso simples de 90° com seqüência de pré-saturação para remoção de sinal de D_2O . Em ambos os casos a janela espectral foi de 8250,81 Hz, com frequência de próton de 400,1319 MHz. Os espectros de ^{13}C -RMN foram obtidos a uma frequência de 100,6185 MHz, e janela espectral de 260 ppm.

O experimento correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (“Correlation Spectroscopy”), que correlaciona prótons de carbonos vizinhos, foi realizado de acordo com Nagayama *et al.* (1980), com seqüência de pré-saturação e ângulo de 45° para o segundo pulso da seqüência. A matriz utilizada foi de 1 K por 1 K (f1:f2), e janela espectral de 10,31 por 10,31 ppm.

O experimento correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY (“Total Correlation Spectroscopy”), que simultaneamente correlaciona prótons de carbonos de uma cadeia, foi realizado segundo Bax & Davis (1985). Utilizou-se a seqüência de chaveamento de spin (“spin lock”) MLEV-17, com tempo de mistura de 2,5 msec.

No experimento de correlação heteronuclear HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy), que correlaciona prótons e carbonos diretamente ligados, com $^1J_{\text{H,C}} \sim 160 - 180$ Hz, utilizou-se matriz de 1 K por 2 K (f1:f2) repetições, com 32 pulsos

e janela espectral de 10 ppm para o ^1H e 160 ppm para o ^{13}C (Bax e Subramanian, 1983; Bax *et al.*, 1986).

No experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) que correlaciona prótons e carbonos acoplados em longa distância, utilizou-se a mesma configuração descrita no HMQC (Bax e Summers, 1986), porém com D2 e D6 abrangendo acoplamentos $^nJ_{\text{H,C}} \approx 3-20$ Hz.

4.13.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras liofilizadas foram analisadas em espectrômetro BOMEM modelo BM-100, do Laboratório Central de Pesquisa e Desenvolvimento - LAC/TEC. Os espectros foram realizados com resolução de 4 cm^{-1} e 20 acumulações para cada amostra. Foram feitas análises pelas técnicas de pastilhas de KBr (aproximadamente 1%) e pela dissolução em metanol. No último caso, o espectro foi obtido do material depositado pela evaporação do solvente em placa de KBr. As duas técnicas forneceram resultados compatíveis.

4.13.3 Espectrometria de massa ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry)

Aliquotas da fração micosporina, obtidas das colunas Sephacryl S-200 ($\text{Abs}_{310\text{nm}} = 1,800$), foram diluídas 20 vezes em metanol. Após isto foram analisadas no aparelho “Electrospray-mass spectrometer” marca Micromass Quattro LC triplo quadrupolo, com calibração por CsI, no modo íon-positivo e modo negativo. O solvente de análise utilizado foi acetonitrila-água 50%, ácido fórmico 0,05%. Para a aquisição dos espectros foi utilizada uma faixa de massa de 100-400 m/z “inter delay scan” de 0,10 s em sistema de aquisição de data contínuo, tempo de aquisição de 0,20 s a 1,60 s. Para produzir a ionização utilizou-se a energia capilar de 2,9 KV na capilar.

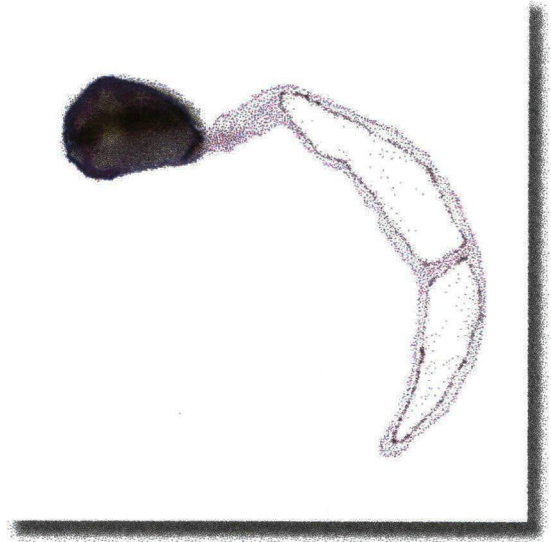
4.14 ENSAIOS BIOLÓGICOS DA FRAÇÃO MICOSPORINA

Utilizou-se a solução de micosporina com absorvância em 310 nm igual à 0,9 (diluição para leitura: 1: 1) que corresponde à 2,8 mM, calculado com base no coeficiente de extinção molar determinado para a micosporina-alanina, $6,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Escolheu-se esta concentração pois no momento das análises pensava-se que a molécula isolada tratava-se deste composto. Assim, nos ensaios de inibição de germinação aplicou-se a concentração 2,8 mM, pouco acima da concentração mais elevada utilizada pelos autores, 2 mM, que produzia 100% de inibição da germinação (Leite & Nicholson, 1992). Optou-se por esta concentração pois nos ensaios preliminares as concentrações menores não produziram nenhum efeito sobre a germinação. Concentrações maiores também foram testadas.

Após completas as análises estruturais, o principal composto da fração micosporina isolada foi sugerida como micosporina-glutamina (detalhado em resultados), de maneira que o coeficiente de extinção molar deixa de ser o apropriado para o composto. Nas presentes análises não obteve-se a eliminação total da água associada à amostra, através de liofilização, evidenciado pelas análises de FTIR em pastilha de KBr, bem como pela característica gelatinosa da amostra. Além disso, a fração obtida mostrou a presença de contaminantes. Conseqüentemente, não foi possível determinar o coeficiente de extinção para a micosporina isolada. Em vista do exposto, optou-se por expressar a concentração de micosporina em absorvância.

Os ensaios sobre a germinação dos conídios foram efetuados de acordo com Leite & Nicholson, (1992) com modificações. Os conídios de 15 dias foram lavados através de centrifugação (1000 x g, 5 minutos) e ressuspensos em água. A suspensão foi ajustada à 1000 - 2000 conídios/mL e adicionada ao mesmo volume de solução de micosporina ou água (controle). Gotas de 40 µl foram colocadas sobre membranas de acetato de celulose

previamente lavadas em água destilada e secas em estufa à 30° C. Os fragmentos desta membrana depositados foram suavemente sobre água colocada no interior de uma placa de Petri (a água formava uma coluna de 0,3-0,4 mm aproximadamente). A placa de Petri foi selada com parafilme, e incubada sob iluminação fluorescente contínua à 20-22° C, durante 16-18 horas. Nestas condições os conídios com 15 dias de idade germinavam em aproximadamente 100%, com formação de apressórios. Foram contadas todas as células, não germinadas e germinadas, localizadas em linha reta ao longo do diâmetro da gota.



Resultados

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ENSAIO PARA A ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA

Alguns métodos de rompimento das células foram testados, como ultra-som e trituração em gral. Porém, em conídios de *C. graminicola* estas técnicas não produziram rompimento eficaz com manutenção da atividade enzimática. O método utilizando microesferas de vidro mostrou-se eficiente, tanto na capacidade de rompimento da parede celular, propiciando a efetiva liberação do conteúdo interno, quanto na preservação da atividade enzimática. Conídios velhos são mais facilmente rompidos pelo método, quando comparados com conídios jovens. O método padronizado produziu o percentual de 90%-100% de rompimento em todas as idades. Observações ao microscópio de luz asseguraram que o homogenato era livre de fragmentos de parede celular ou fantasmas celulares. Considerando que testes preliminares demonstraram que conídios velhos apresentam maior atividade, optou-se pelo uso de conídios com 50 dias de idade para padronização da atividade da fosfatase ácida.

A atividade enzimática aumenta linearmente até 60 minutos de incubação, atingindo um platô a partir de 90 minutos (Fig. 4). Escolheu-se o tempo de 10 minutos para a incubação dos demais ensaios. O efeito da concentração de proteína no homogenato está observado na figura 5. Na figura observa-se o aumento linear da atividade até a concentração de 16 μg de proteína no ensaio. Concentrações maiores que 50 μg foram testadas, porém nessa faixa atinge-se o platô. Os demais ensaios foram efetuados na faixa de 5-10 μg de proteína.

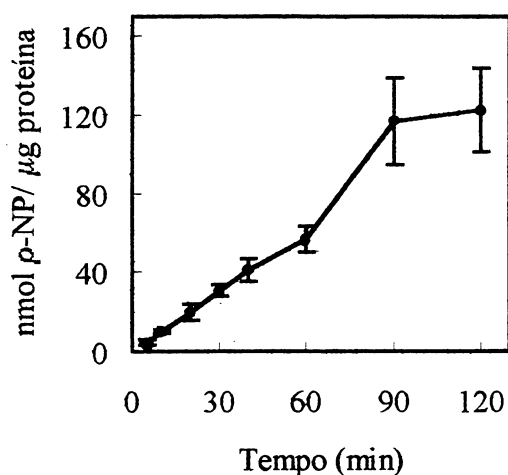


Fig. 4

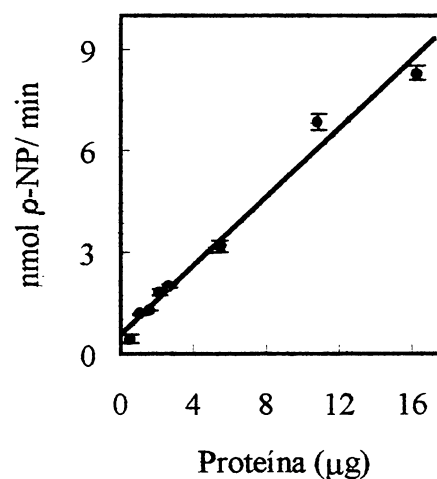


Fig. 5

Figura 4 - Efeito do tempo sobre a atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.

A atividade enzimática foi ensaiada em diferentes tempos de incubação. As demais condições foram idênticas às descritas na metodologia (item 4.2.2). As barras representam desvio padrão de dois experimentos em triplicata.

Figura 5 - Efeito da concentração de enzima sobre a atividade da fosfatase ácida do homogenato de conídios não germinados.

A atividade enzimática foi ensaiada em diferentes concentrações de proteína presente no homogenato. As demais condições foram idênticas às descritas na metodologia (item 4.2.2). As barras representam desvio padrão de triplicata de um experimento representativo de outros três.

O pH ótimo da enzima é 5,5 (Fig. 6), usando acetato de sódio, clássico tampão no estudo desta enzima (Pasqualini *et al.*, 1992; Galabova *et al.*, 1993). O efeito da temperatura é observado na figura 7. A atividade aumenta com a temperatura até 60° C, chegando próximo à zero em 80°C. Os demais ensaios foram realizados na temperatura de 37°C, pois é uma temperatura mais fisiológica, além de ser nesta faixa que a maioria dos trabalhos em fungos ensaiam a atividade (Pasqualini *et al.*, 1992; Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993; Galabova *et al.*, 1993).

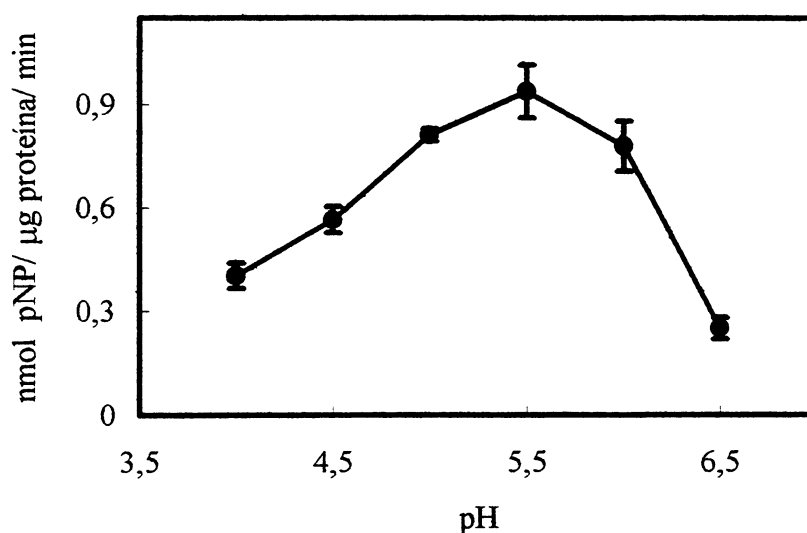


Figura 6 - Efeito do pH sobre a atividade da fosfatase ácida em homogenato de conídios não germinados.

A atividade enzimática foi ensaiada em tampão acetato 50 mM na faixa de pH indicada no gráfico. As demais condições foram idênticas às descritas na metodologia (item 4.2.2). As barras representam desvio padrão de dois experimentos em triplicata.

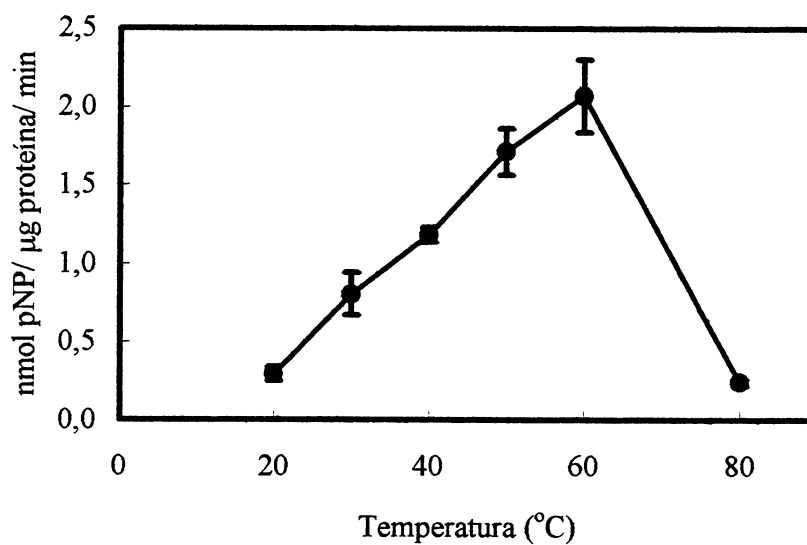


Figura 7 - Efeito da temperatura sobre a atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.

A atividade enzimática foi ensaiada em diferentes temperaturas. As demais condições foram idênticas às descritas na metodologia (item 4.2.2). As barras representam desvio padrão de dois experimentos em triplicata.

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade da fosfatase ácida ensaiada no homogenato em pH 5,5 é observado na figura 8. Observa-se a saturação da enzima a partir de 2 mM. Graficamente, o inverso da velocidade da reação em função do inverso da concentração de substrato (Lineweaver-Burk “plot”) mostrou o K_M (constante de Michaelis) aparente para o pNPP igual a 0,631 mM (Fig. 5, inserto). A concentração saturante 3 mM do substrato foi a escolhida para os demais ensaios.

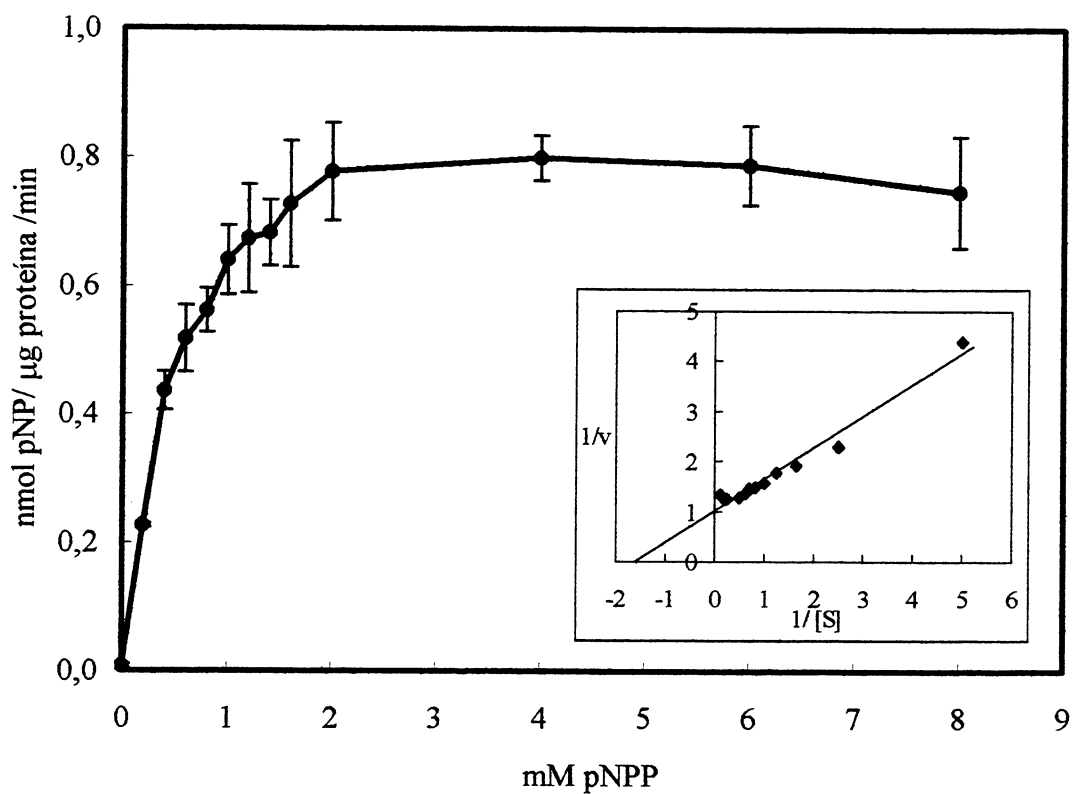


Figura 8 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados.

O meio de reação continha diferentes concentrações de pNPP. As demais condições foram idênticas às descritas na metodologia (item 4.2.2). As barras representam desvio padrão de dois experimentos em triplicata.

5.2 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA EM CONÍDIOS INTACTOS E PERMEABILIZADOS

Para estudos de comparação quantitativa entre atividade intra e extracelulares, inicialmente foram padronizadas as condições de permeabilização. Foram testadas concentrações de Triton X-100 na faixa de 0,05 à 0,4%, na temperatura de 37° C, sobre a atividade da enzima (Fig. 9). Optou-se pela concentração 0,1%, utilizada na literatura (Galabova *et al.*, 1993). Nesta concentração observa-se que até 30°C a permeabilização é muito pequena, o que se reflete na baixa atividade enzimática. De 30 a 50°C ocorre um aumento da atividade, a qual estabiliza-se nas temperaturas de 50 e 60°C (Fig. 10). A adição de Triton X-100 0,1 % ao homogenato, nas condições descritas no item 4.2.1 não afeta a atividade enzimática.

A suspensão de conídios inteiros não tratados com Triton X-100 (células intactas) apresenta baixa atividade, enquanto que as células permeabilizadas com o detergente, exibem maior atividade da fosfatase ácida (Fig. 11). Estes resultados demonstram que a enzima localiza-se principalmente no interior celular, embora uma pequena fração da atividade extracelular seja observada. A predominante localização intracelular é confirmada pelos estudos citoquímicos demonstrando a presença do produto de reação principalmente associado à membrana vacuolar (Fig. 21).

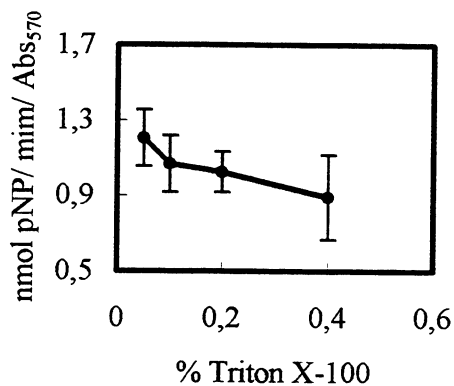


Fig. 9

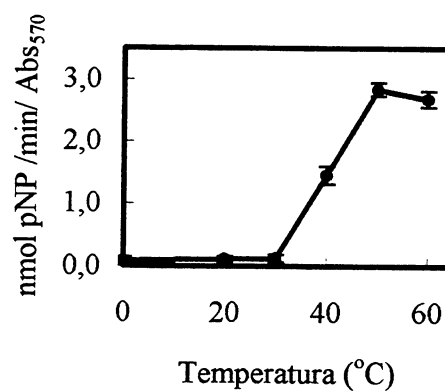


Fig. 10

Figura 9 - Efeito da concentração de Triton X-100 sobre a permeabilização celular em conídios inteiros.

A suspensão de conídios com 15 dias de idade ($Abs_{570nm} = 0,8$) foi incubada com diferentes concentrações de Triton X-100 durante 30 minutos. A seguir, a atividade da fosfatase ácida foi ensaiada de acordo com a metodologia (item 4.3). A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por minuto por absorbância, em 570 nm, da suspensão de conídios. As barras representam o desvio padrão de dois experimentos, efetuados em triplicata.

Figura 10 - Efeito da temperatura sobre a permeabilização com Triton X-100.

A suspensão de conídios com 15 dias de idade ($Abs_{570nm} = 0,8$) foi incubada com Triton X-100 0,1 % durante 30 minutos em diferentes temperaturas. A seguir, a atividade da fosfatase ácida foi ensaiada de acordo com a metodologia (item 4.3). A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por minuto por absorbância (em 570 nm) da suspensão, de conídios. As barras representam o desvio padrão de dois experimentos, efetuados em triplicata.

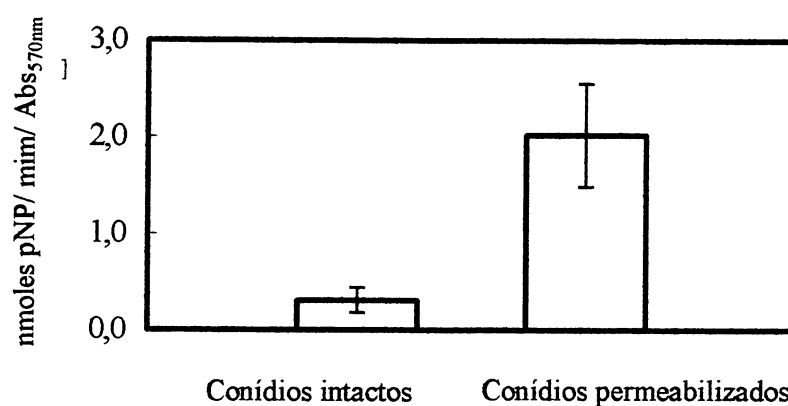


Figura 11 - Atividade da fosfatase ácida no conídio inteiro intacto e permeabilizado com Triton X-100 .

Conídios intactos (não permeabilizados) e conídios permeabilizados com Triton X-100 foram incubados para determinação da atividade enzimática nas condições descritas na metodologia (item 4.3). A atividade específica foi expressa em nanomoles de p-nitrofenol por minuto por absorvância da suspensão de conídios ($Abs_{570nm} = 0,7 - 0,8$). As barras representam o desvio padrão de três experimentos em triplicata.

5.3 FOSFATASE ÁCIDA NO HOMOGENATO DURANTE A GERMINAÇÃO

Uma vez padronizadas as condições ótimas de ensaio, partiu-se para a comparação da atividade enzimática entre o homogenato de conídios não germinados e de conídios germinados. A atividade da fosfatase ácida medida no homogenato de conídios germinados mostrou-se menor que nos conídios não germinados (Fig. 12). Esta comparação apresenta alguns problemas. Primeiramente, o homogenato do conídio germinado é obtido do rompimento do conjunto do conídio, tubo germinativo e apressório (Fig. 17C), uma vez que a separação do conídio do restante das estruturas de infecção não foi conseguida. Conseqüentemente, a atividade do homogenato do conídio não germinado foi comparada com a atividade de uma estrutura muito mais complexa, formada pelo próprio conídio em outro estadio, pelo tubo germinativo e pelo apressório. Além disso, como foi observado posteriormente nos estudos morfológicos, o conídio não germinado apresenta o citoplasma repleto de lipídios (Figs. 14D, 17A, 21A) e o apressório apresenta grande número de organelas e ribosomas (Figs. 18A, 19A-C), dois tipos celulares totalmente diferentes. Assim, se os dois tipos apresentarem quantidades diferentes de proteína a comparação da atividade específica poderá apresentar erro. Nesta situação, os estudos citoquímicos, descritos nas figuras 21-30, contribuem no o monitoramento da enzima durante o processo germinativo.

Pode-se especular também que, com o rompimento das células, a enzima sendo liberada dos vacúolos poderia entrar em contato com componentes existentes na fase germinativa, como proteases, que poderiam afetar a sua atividade. Porém, ensaios em presença de PMFS 1 mM não modificaram a atividade da fosfatase ácida.

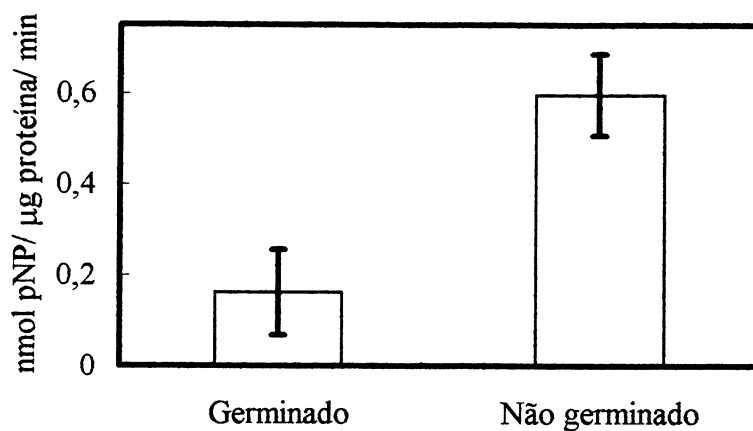


Figura 12 - Atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados e germinados.

A atividade enzimática foi ensaiada no homogenato de conídios não germinados e conídios germinados sobre microesferas de vidro, nas condições descritas na metodologia (item 4.4). As barras representam o desvio padrão de três experimentos em triplicata.

5.4 ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA NO HOMOGENATO DURANTE O ENVELHECIMENTO DOS CONÍDIOS

O monitoramento da atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios com idades variando de 5-65 dias, com intervalo de dez dias, demonstrou que existe uma correlação positiva entre envelhecimento e a atividade da enzima (Fig. 13). Observou-se que na idade de 65 dias a atividade enzimática é aproximadamente 100% maior que a atividade encontrada em conídios com 5 dias.

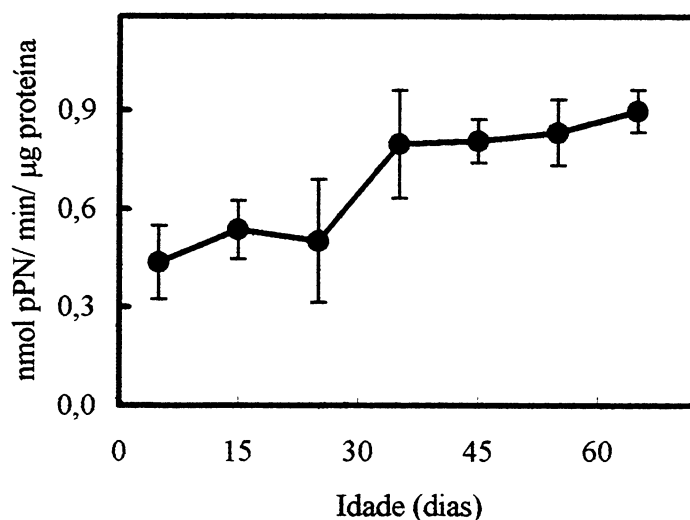


Figura 13 - Variação da atividade da fosfatase ácida no homogenato de conídios não germinados durante o envelhecimento.

A atividade foi ensaiada no homogenato obtido de conídios de diferentes idades, de acordo com a metodologia (item 4.5). As barras representam o desvio padrão de três experimentos em triplicata.

Para a implementação da análise citoquímica da fosfatase ácida, o primeiro passo foi estabelecer uma metodologia que permitisse o processamento para M. E. T.. Nos últimos anos tem-se desenvolvido a germinação sobre superfícies artificiais e o uso da criofixação (Bourett & Howard, 1990; Van Dyke & Mims, 1991). Foi testada a fixação química de conídios germinados sobre superfícies artificiais, que resultou em um modelo adequado não só para o estudo ultraestrutural, como também para as análises citoquímicas. Nas seções seguintes serão descritos os principais aspectos morfológicos e ultraestruturais, pré-requisitos para a compreensão das análises citoquímicas da atividade da fosfatase ácida e do processo germinativo em si.

5.5 RESERVAS NUTRICIONAIS EM *C. graminicola*

Análises com a coloração de Sudan III mostraram que o surgimento dos lipídios no interior do conídio é concomitante com a sua formação (Figs. 14A-14C). Os resultados sugerem o envolvimento da célula conidiogênica na síntese dos lipídios (Figs. 14A-14B). Na figura 14C pode-se observar um conídio aparentemente nas etapas finais de sua formação, embora ainda ligado à célula conidiogênica. Comparando os conídios de 15, 35 e 65 dias observa-se a diminuição gradual dessas reservas nutritivas (Figs. 14D -14F).

Na figura 15 observa-se a mobilização dos lipídios durante o processo germinativo. O citoplasma dos conídios não germinados é repleto de reservas lipídicas, as quais são consumidas e/ou transferidas ao tubo germinativo e apressório formados (Fig.15A-15C). A medida que o processo germinativo avança, o número de corpos lipídicos decresce no interior do conídio. O conídio germinado é geralmente separado em dois compartimentos por um septo (Figs. 15C-15D). Frequentemente observa-se o desaparecimento de lipídios de uma das

metades, seguida da outra metade (Fig. 15C). Após melanização do apressório, nenhum corpo lipídico é observado no conídio germinado (Fig. 15D).

A figura 16 mostra o conídio não germinado submetido à coloração com Sudan e pós-corado com verde rápido. Esta coloração tem os objetivos de evidenciar a vacuolização durante a germinação e verificar concomitantemente a presença dos lipídios. Como pode-se observar na figura 16A, no conídio não germinado, com a pós coloração a região do núcleo torna-se evidente, porém devido ao pequeno tamanho do vacúolo neste estadio o mesmo não é observado através desta metodologia. A seqüência da formação das estruturas de infecção (Figs. 16B-16E) mostram que os lipídios, além de decrescer no conídio durante a germinação, conforme verificado anteriormente (Fig. 15) são observados dentro dos vacúolos. Este fenômeno é particularmente evidente nas figuras 16B e 16D. Material lipídico também é observado no interior do apressório em formação (Fig. 16C). Após completa melanização do apressório, os lipídios não são observados no conídio germinado (Fig. 16E). Neste estadio, o conídio germinado apresenta-se esvaziado, não só de lipídios, mas também do material citoplasmático corado pelo verde rápido. Esses resultados confirmam as observações feitas em microscopia eletrônica mostrando a vacuolização do conídio germinado (Fig. 24). O septo divide o conídio germinado (Fig. 16E) e observa-se que primeiro os lipídios desaparecem de uma das metades uma das metades do conídio, seguindo-se o desaparecimento dos lipídios da outra metade (Fig. 16C).

Figura 14 - Conteúdo intracelular de lipídios observados pela técnica de Sudan III em conídios em formação, com 15, 35 e 65 dias de idade. O material lipídico está corado em vermelho. Ampliação= 1.379 x.

Fig. 14A - Conídio (c) em formação. Observa-se a presença de lipídios no interior da célula conidiogênica (Cc) e do conídio em formação (c). Ainda não se observa a morfologia falcada característica do conídio.

Fig. 14B - Conídio em formação, no qual já se observa o formato falcado, característico do conídio (c). Material lipídico no interior do conídio e da célula conidiogênica (Cc) é observado.

Fig. 14C - Conídio (c), exibindo o citoplasma repleto de lipídios, ainda ligado à célula conidiogênica (Cc), na qual não são observados lipídeos.

Fig. 14D - Conídios com 15 dias de idade mostrando o citoplasma repleto de lipídeos.

Fig. 14E - Conídios com 35 dias de idade. Observa-se granulações lipídicas (seta) no citoplasma.

Fig. 14F - Conídios com 65 dias de idade apresentando menor número de granulações lipídicas dispersas no citoplasma (seta).

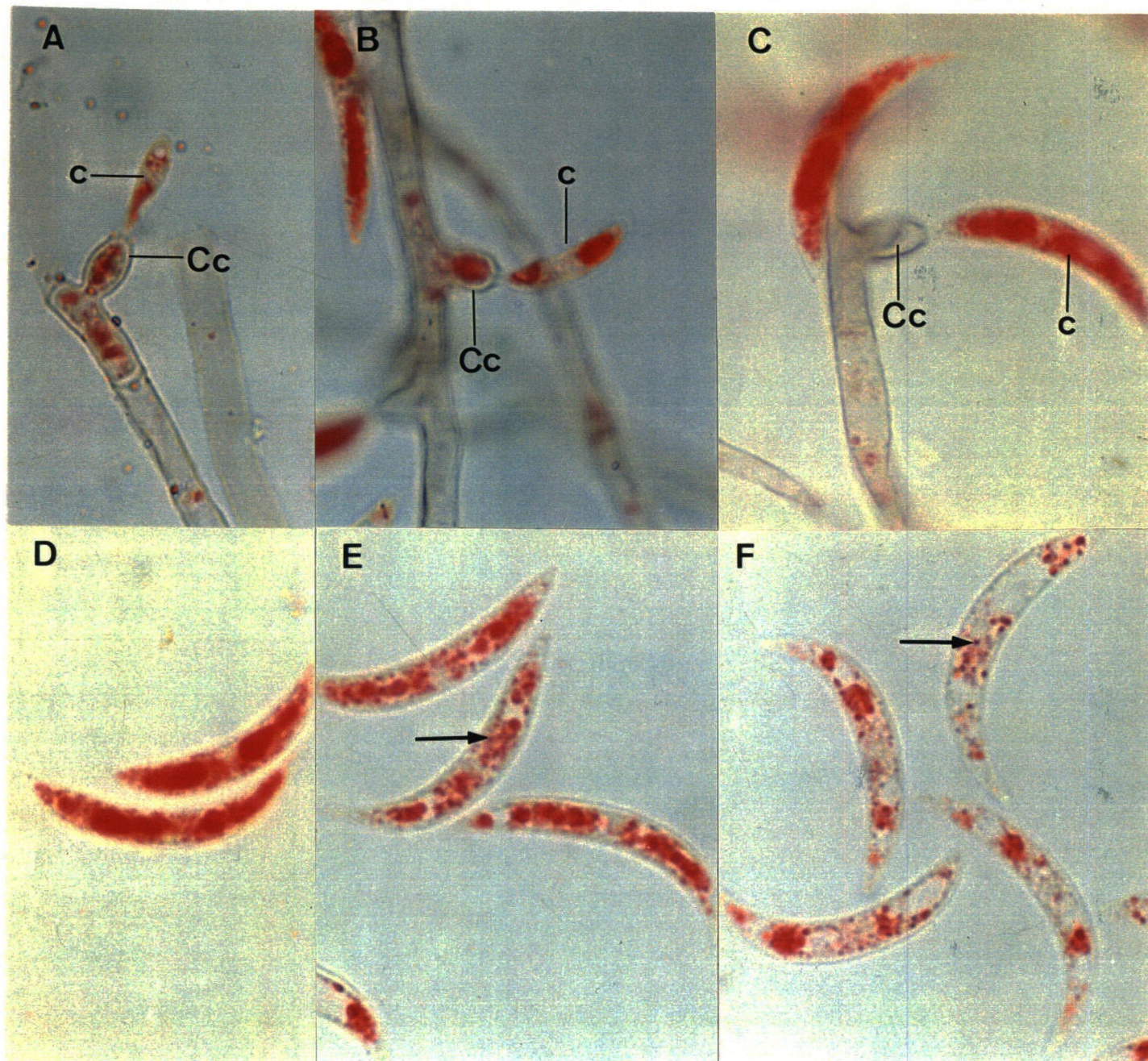


Figura 14 - Conteúdo intracelular de lipídios observados pela técnica de Sudan III em conídios em formação, com 15, 35 e 65 dias de idade

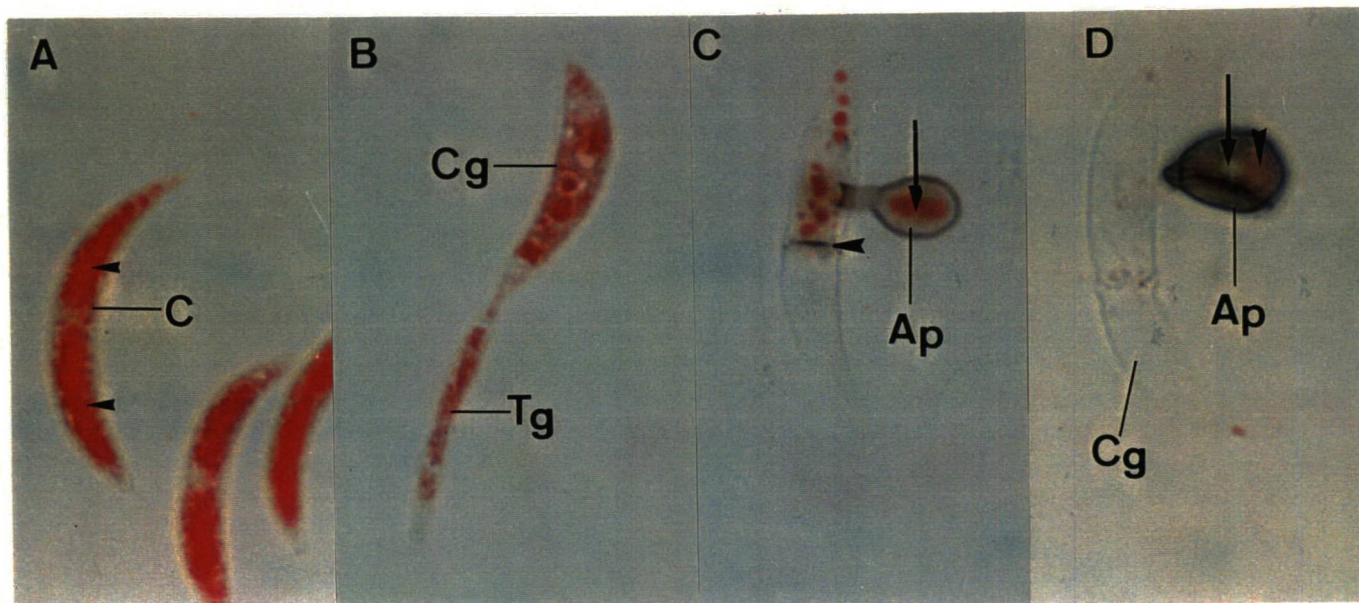


Figura 15 - Mobilização dos lipídios durante a germinação de conídios de *C. graminicola* monitorada pela reação citoquímica de Sudan III.

Fig.15A - Conídio não germinado (C) exibindo o citoplasma repleto de reservas lipídicas (ponta de seta).

Fig. 15B - Conídio germinado (Cg) apresentando lipídios no tubo germinativo (Tg).

Fig. 15C - Conídio germinado e apressório em formação. O conídio germinado está dividido pelo septo (ponta de seta), sendo que os depósitos lipídicos não são mais observados em uma das metades. Material lipídico (seta) também é verificado no apressório (Ap).

Fig. 15D - Apressório totalmente melanizado. Depósitos lipídicos (ponta de seta) são observados no interior do apressório (Ap). Em contraste, nenhum material lipídico é verificado no conídio germinado. Nota-se a região circular clara correspondente ao poro do apressório (seta). Ampliação: 1000 x.

Figura 16 - Mobilização de lipídios e vacuolização durante a germinação de conídios demonstrados pela coloração com Sudan III e pós-coloração com verde rápido. O material lipídico é corado em vermelho. Ampliação = 945 X.

Fig 16A - Conídio não germinado mostrando o abundante material lipídico no citoplasma (ponta de seta) e região correspondente ao núcleo (seta).

Fig 16B - Conídio germinado (Cg) exibindo lipídios dentro de vacúolos (setas) durante a formação do tubo germinativo (Gt).

Fig. 16C - Conídio germinado exibindo uma metade quase vazia (estrela) e a outra contendo depósitos lipídicos (asterisco). Lipídios (seta) são vistos dentro do apressório (Ap).

Fig. 16D - Conídio germinado exibindo material lipídico dentro de vacúolo (seta). Note o pequeno número de depósitos lipídicos neste estágio.

Fig. 16E - Conídio germinado apresentando somente traços de lipídeos. Nota-se a completa melanização do apressório (Ap) e o septo (s) que divide o conídio germinado.

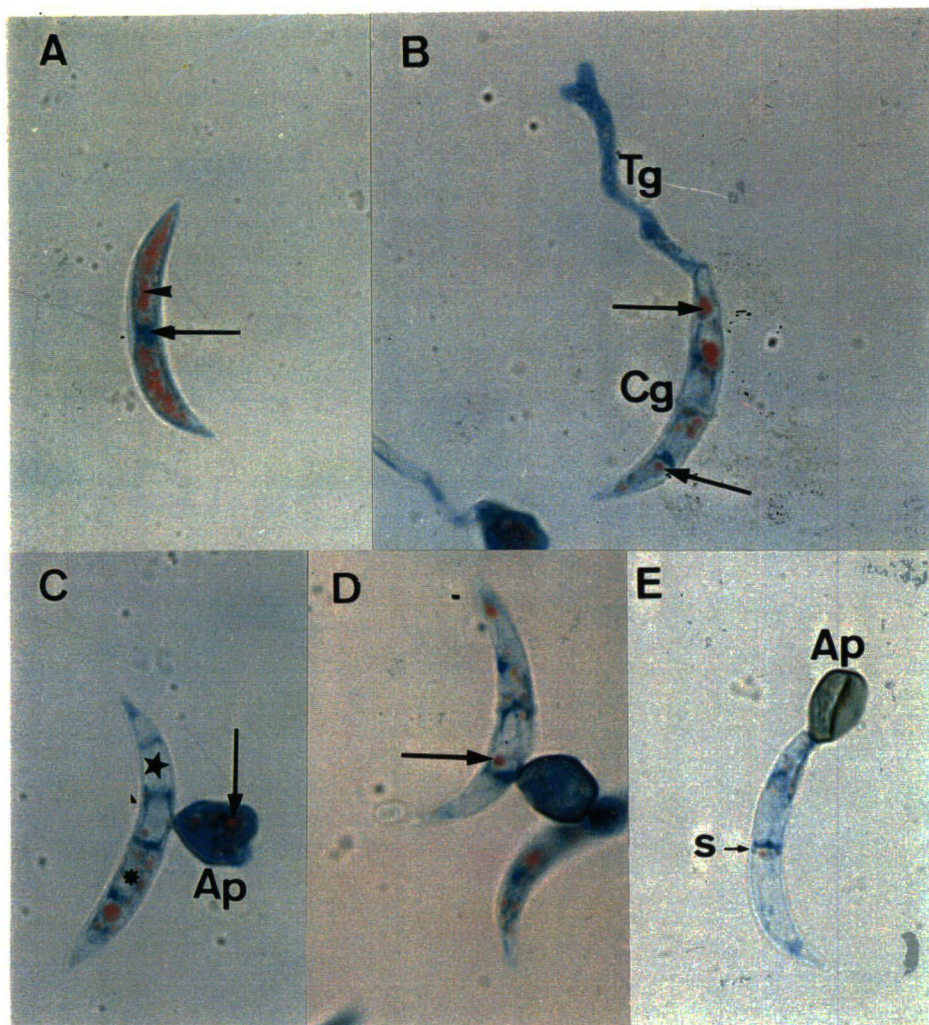


Figura 16 - Mobilização de lipídios e vacuolização durante a germinação de conídios demonstradas pela coloração com Sudan III e pós-coloração com verde rápido

Os estudos ultraestruturais confirmam e detalham a organização do material lipídico em *C. graminicola*. O conídio não germinado apresenta o citoplasma tomado por corpos de lipídios que apresentam aspecto transparente quando submetidos a desidratação lenta, devido a extração pela acetona (Fig. 17A). Em conídios não germinado também são observados grânulos elétron densos que provavelmente representam glicogênio (Mims *et al.*, 1995), os quais depositam-se principalmente na periferia e extremidade do citoplasma (Fig. 17B). A parede celular dos conídios não germinados é formada por uma camada interna mais espessa e uma camada externa mais delgada (Fig. 17B).

Os lipídios no apressório apresentam organização intracelular diversa do conídio não germinado, formando grandes depósitos (Fig. 17C), geralmente associados a vesículas. Detalhe dessa associação está mostrado na figura 17D, onde observa-se a justaposição entre essas duas estruturas. Estas vesículas exibem conteúdo que podem apresentar-se muito (Fig. 17D) ou moderadamente elétron denso (Fig. 19) nas preparações contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Nas reações citoquímicas da fosfatase ácida observa-se a presença do produto de reação no interior das vesículas do apressório (Figs. 26-27, 29-30), enquanto no controle, sem contrastação, o conteúdo central das vesículas é fracamente elétron denso (Fig. 28). Outras reações citoquímicas serão necessárias para esclarecer melhor a natureza do conteúdo destas organelas.

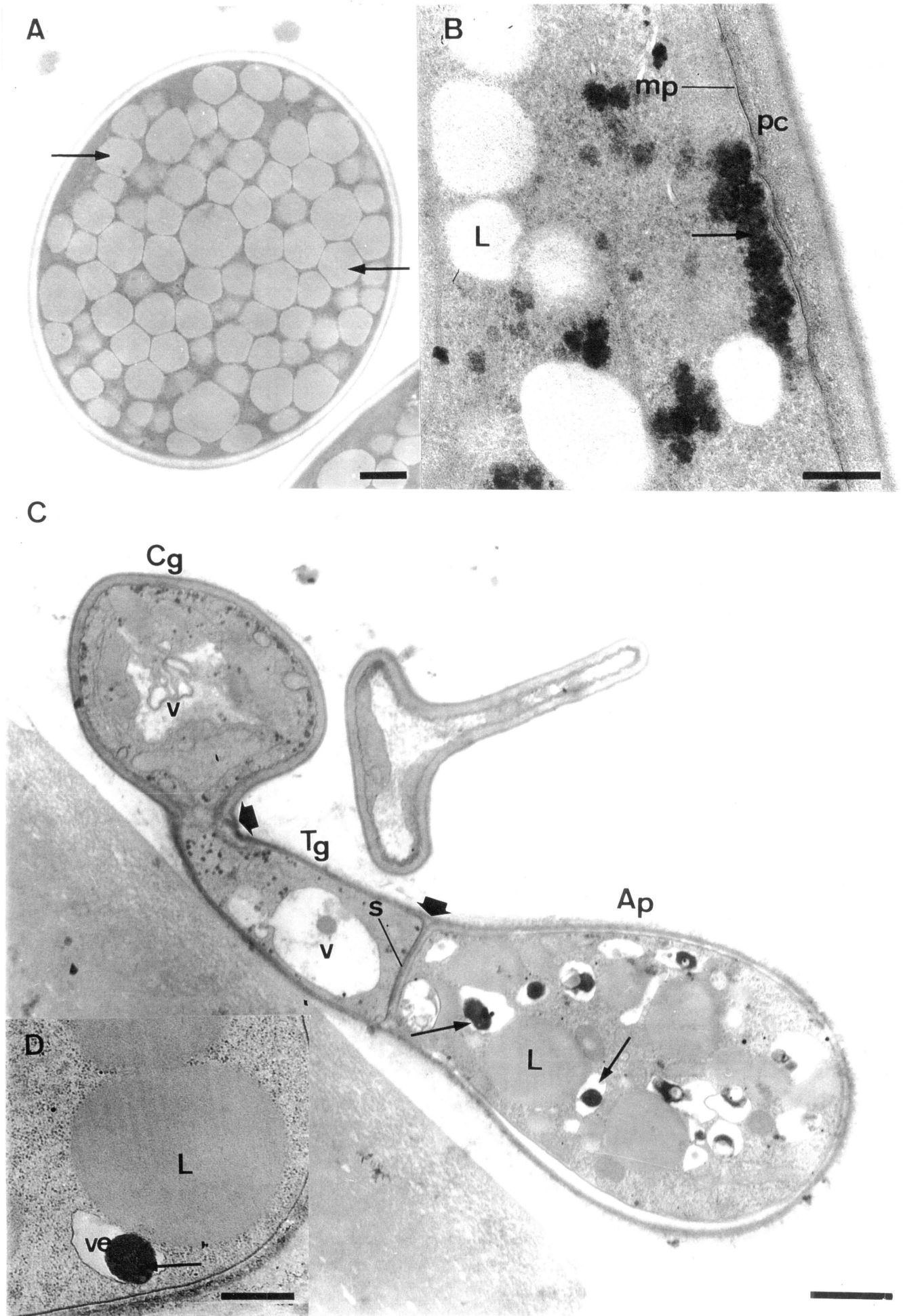
Figura 17 - Reservas nutricionais em conídios não germinados e germinados observados através de microscopia eletrônica de transmissão

Figura 17A - Conídio não germinado submetido à desidratação lenta, em corte transversal, repleto de corpos lipídicos extraídos (setas) observado através de M. E. T. Barra = 500 nm.

Figura 17B - Grânulos elétron densos em conídio não germinado. Observam-se grânulos, provavelmente de glicogênio, na periferia do citoplasma (seta), corpos lipídicos (L), membrana plasmática (mp) e parede celular (pc). O conídio foi submetido à desidratação lenta. Barra = 200 nm.

Figura 17C - Aspectos do conídio germinado sobre membrana de celofane. As setas grossas delimitam o conídio germinado (Cg), tubo germinativo (Tg) e apressório (Ap). Vacúolos (v) são observado no conídio germinado (Cg) e tubo germinativo (Tg). O tubo germinativo é separado do apressório por um septo (s). Corpos lipídicos (L) próximos a vesículas (setas) são proeminentes no citoplasma. Barra = 1 μ m.

Figura 17D - Vesícula próxima à corpo lipídico no apressório. Nota-se a justaposição de vesícula (ve) contendo material elétron denso (seta) ao corpo lipídico (L). Barra = 500 nm.



5.6 CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DA GERMINAÇÃO

O processo de penetração está representado na figura 18. A parede celular do apressório torna-se progressivamente mais delgada e desaparece na região do poro, permitindo a justaposição da membrana apressorial diretamente com a membrana de celofane (Fig. 18A). Subseqüentemente, abundante material elétron denso é observado na região abaixo do poro, no interior da membrana de celofane (Fig. 18B). Na figura 18C observa-se o início da formação da hifa de penetração. Finalmente, observa-se a hifa de penetração em um estadio mais adiantado, atingindo porções mais profundas do celofane (Fig. 18D).

O apressório é separado do tubo geminativo por um septo (Fig. 17C) e é binucleado (Fig. 18A). Na organização citológica destaca-se a presença de vesículas, sendo que a maioria delas está justaposta aos depósitos lipídicos (Figs 17C, 17D, 18A). Apresenta também mitocôndrias, numerosos ribosomas livres e microcorpos (Fig. 19A). Polisomas são observados, como na figura 19B. Na figura 19C observa-se detalhe de característico retículo endoplasmático granular. O conteúdo das vesículas presentes no apressório varia de grânulos fortemente elétron densos (Figs. 17C, 17D) a material com elétron densidade que assemelha a lipídios (Fig. 19A). Freqüentemente, a proximidade entre vesículas, corpos lipídicos, mitocôndria e microcorpos é verificada (Fig. 19A).

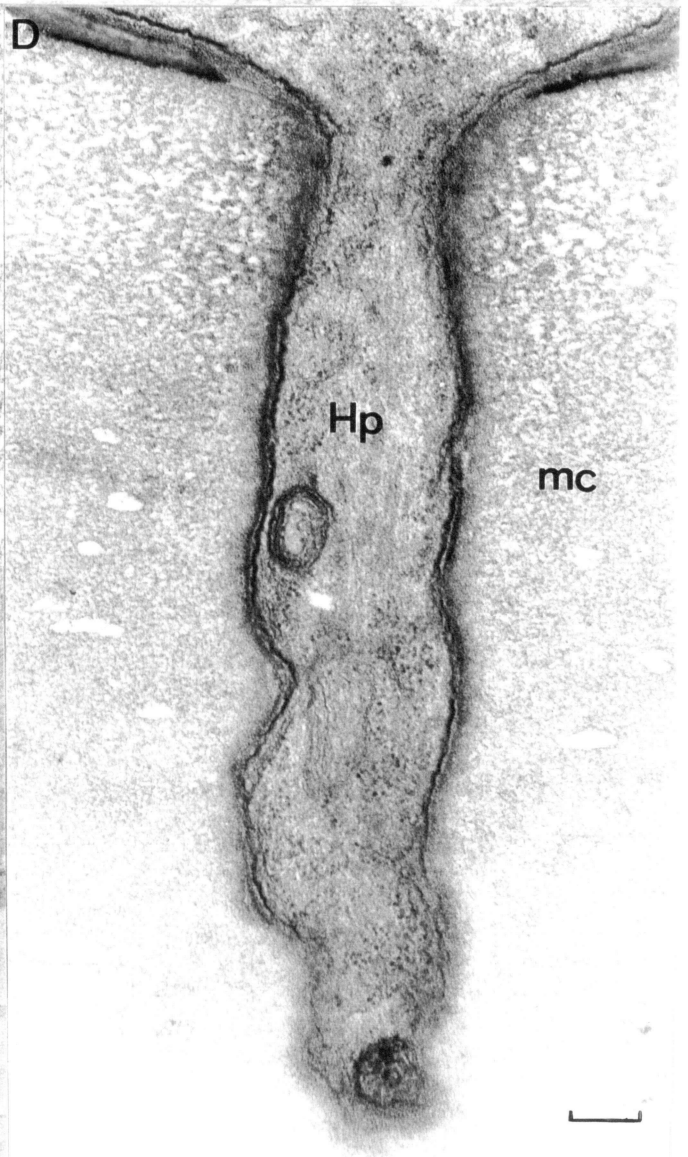
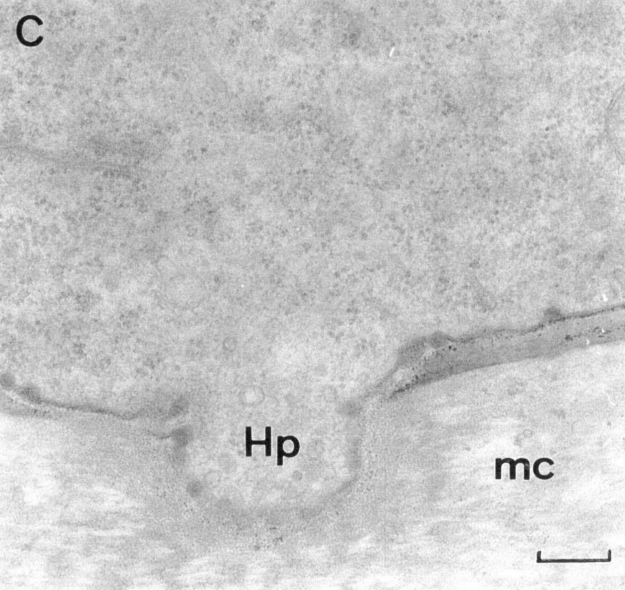
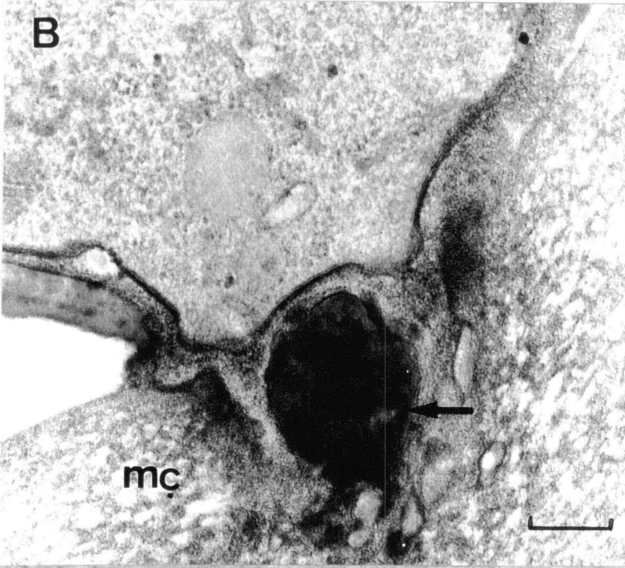
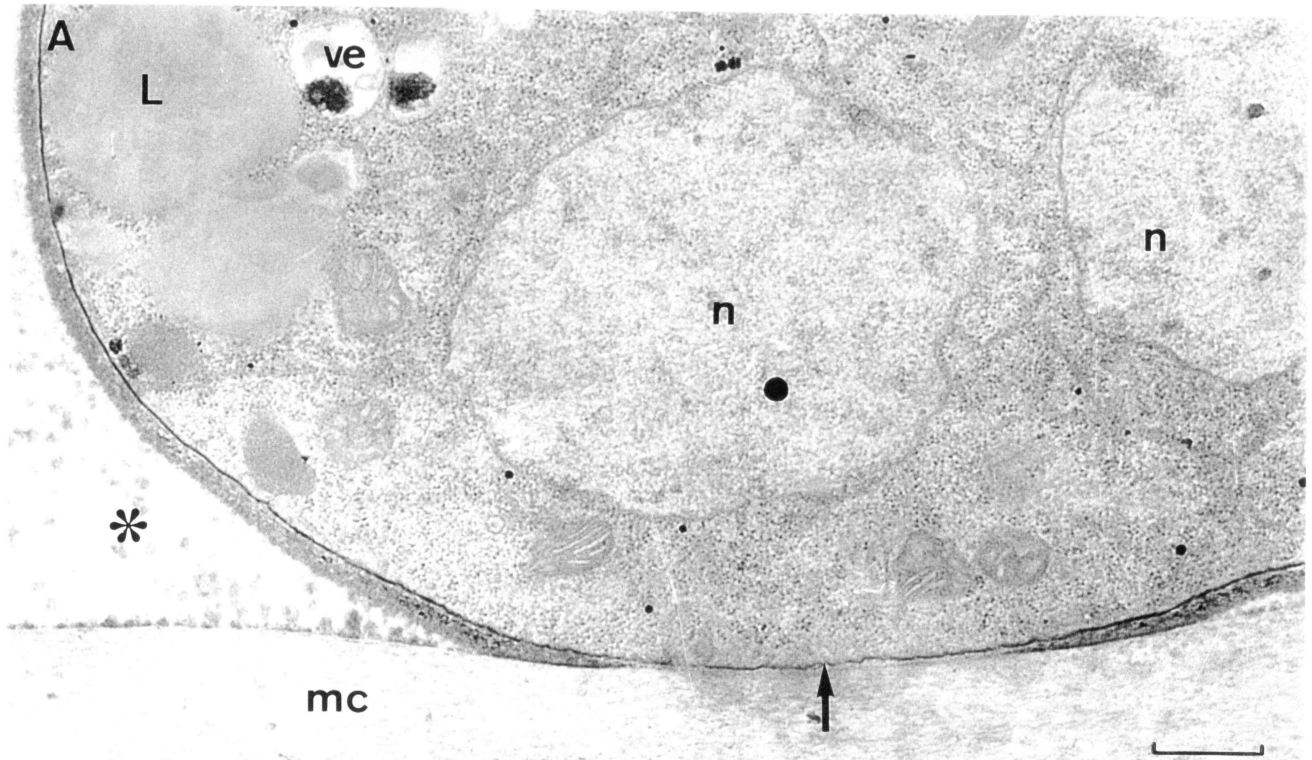
Figura 18 - Aspectos ultraestruturais do processo de penetração.

Fig. 18A - Parede basal do apressório exibindo um poro. A membrana plasmática do apressório (seta) está justaposta à membrana de celofane (mc) na região do poro. Dois núcleos (n), corpos lipídicos (L) e vesículas (ve) são observadas. A matriz extracelular (asterisco) estende-se do apressório à superfície da membrana de celofane. Barra = 500 nm.

Fig. 18B - Abundante material elétron denso (seta) é observado na membrana de celofane (mc) na região imediatamente abaixo do poro. Barra = 200 nm.

Fig. 18C - Estágio inicial da penetração em membrana de celofane. A hifa de penetração (Hp) em estágio inicial de formação é observada adentrando a membrana de celofane (mc). Barra = 200 nm.

Fig. 18D - Estágio adiantado da penetração em membrana de celofane. A hifa de penetração (Hp) é observada em regiões mais profundas da membrana de celofane (mc). Barra = 250 nm..



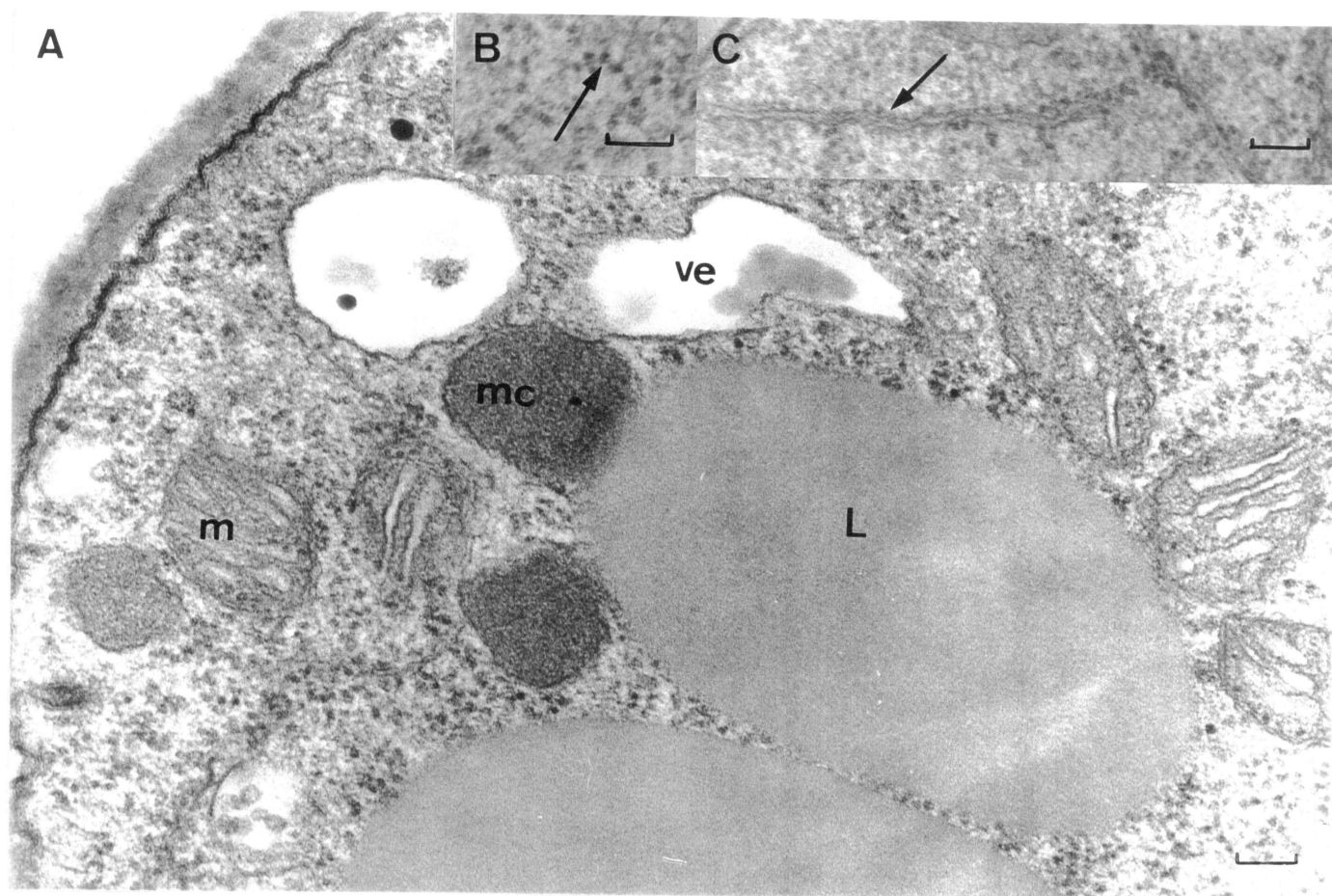


Figura 19 - Detalhes da ultraestrutura do apressório.

Fig. 19A - Observa-se a proximidade entre entre corpos lipídicos (L), mitocôndrias (m), microcorpos (mc) e vesículas (ve). Barra = 100 nm. Fig. 19B - Detalhe mostrando um polisoma (seta). Barra = 100 nm. Fig. 19C - Detalhe mostrando o retículo endoplasmático rugoso (seta). Barra = 250 nm.

A parede celular do apressório exibe, no lado adjacente à membrana plasmática, uma delgada camada fortemente eletrônica densa (Fig. 20A). O lado externo é contínuo com abundante matriz extracelular, de aspecto fibrilar. Esta matriz estende-se à membrana de celofane (Figs. 20C-20D) e a todas as superfícies que circundam o apressório, como a parede celular do tubo geminativo (Fig. 20B). Na região basal observa-se modificações na estrutura da parede celular na região da penetração da hifa de penetração (Fig. 20C). A parede de tubo geminativo é semelhante à parede celular do conídio (Fig. 17B) apresentando continuidade com a matriz extracelular na face voltada para o apressório (Fig. 20B).

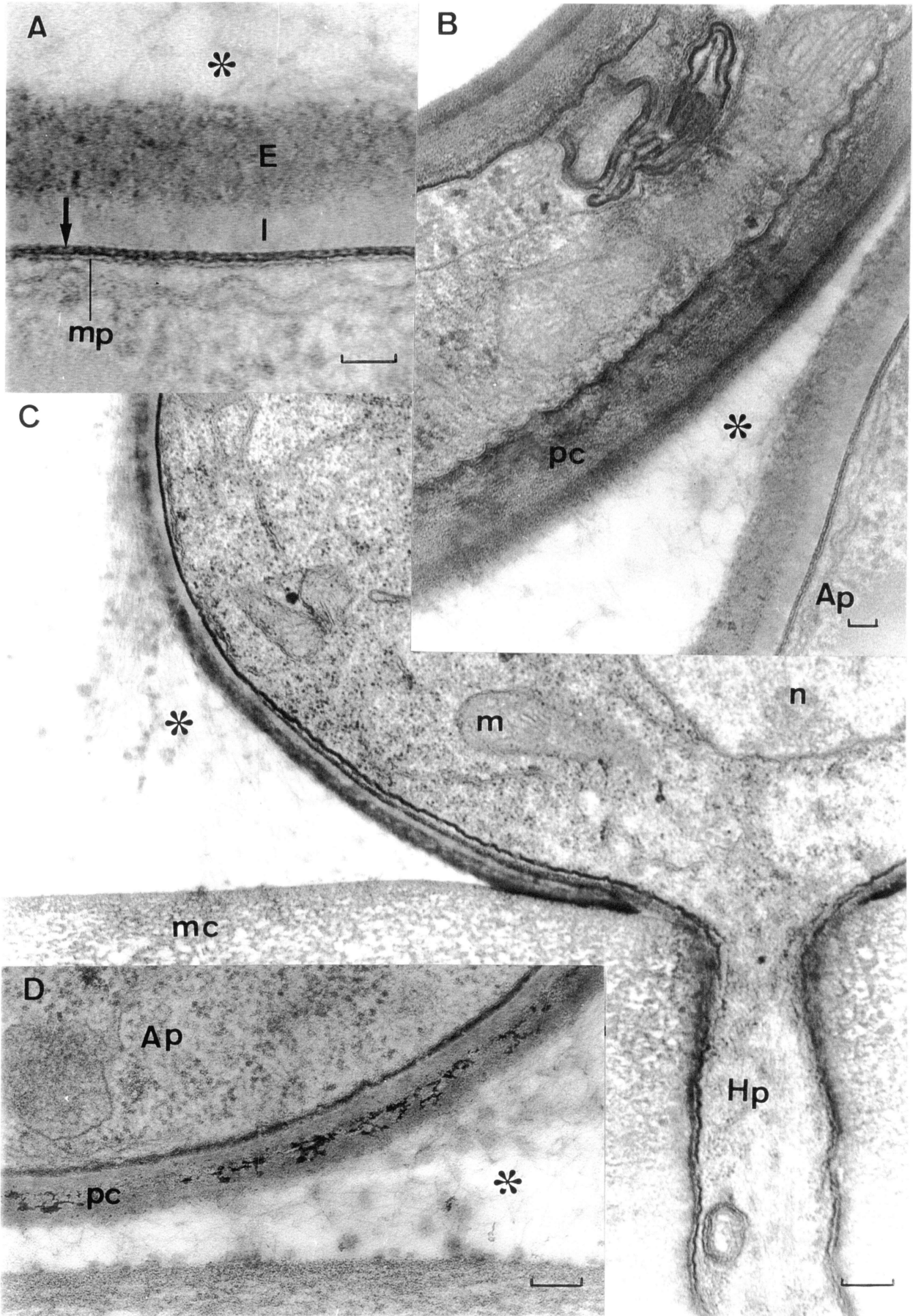
Figura 20 - Ultraestrutura da parede celular do apressório

Fig. 20A - Detalhe da ultraestrutura da parede celular do apressório. Observa-se uma delgada camada elétron densa (seta) adjacente à membrana plasmática (mp), a camada interna (I), camada externa (E) contínua com a matriz extracelular (asterisco). Barra = 50 nm.

Fig. 20B - Parede celular do tubo germinativo adjacente ao apressório. A parede celular (pc) do tubo germinativo é contínua com a matriz extracelular (asterisco) que se estende até o apressório (Ap). Barra = 50 nm.

Fig. 20C - Conexão da matriz extracelular do apressório à membrana de celofane. A matriz extracelular (asterisco) estende-se de regiões superiores da parede celular do apressório e conecta-se na membrana de celofane (mc). Hifa de penetração (Hp), núcleo e mitocôndrias (m) são observados. Barra = 250 nm.

Fig. 20D - Parede celular na parte basal do apressório. A matriz extracelular (asterisco) ~~estende-se~~ estende-se da parede celular (pc) do apressório (Ap) e conecta-se à membrana de celofane (cm). Barra = 50 nm.



5.7 ANÁLISE CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA

5.7.1 Fosfatase ácida no conídio não germinado

Nas análises citoquímicas foi verificada idêntica localização ultraestrutural da enzima utilizando β -glicerofosfato de sódio ou pNPP como substratos. Porém, a formação do produto, quando o pNPP é usado como substrato, ocorre em pequeno número de células, sugerindo que o substrato não apresenta boa penetração. Optou-se então pelo uso do β -glicerofosfato de sódio, classicamente utilizado na reação citoquímica (Hislop *et al.*, 1974; Rijn *et al.*, 1975; Rosing, 1984; Ruch & Motta, 1987; Hänsler *et al.*, 1975; Saito, 1995) enquanto o pNPP é o substrato de eleição em métodos espectrofotométricos (Galabova *et al.*, 1993), sendo eventualmente utilizado em métodos citoquímicos (Bowen & Bryant, 1978). Dessa maneira, nos estudos citoquímicos foi usado o β -glicerofosfato de sódio enquanto nos estudos espectrofotométricos foi usado o pNPP.

A visão panorâmica do conídio não germinado processado para reação citoquímica para fosfatase ácida revelou a presença de grande número de corpos lipídicos, os quais aparecem como corpos elétrons densos, um núcleo, e geralmente dois vacúolos, que exibem o produto da reação (Fig. 21A) associado à face interna da membrana vacuolar (Fig. 21B). As imagens sugerem que estes vacúolos apresentam a capacidade de internalizar diferentes componentes do citoplasma.

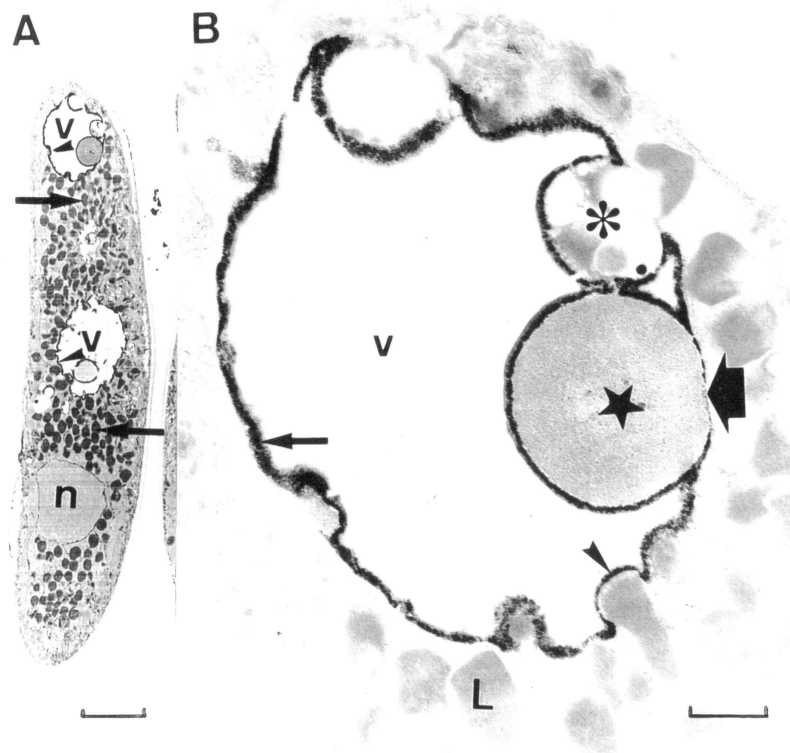


Figura 21 - Produto de reação da fosfatase ácida: localização intravacuolar

Fig. 21A - Visão panorâmica do conídio não germinado em corte longitudinal. O produto de reação para fosfatase ácida (ponta de seta) encontra-se dentro de vacúolos (v). Numerosos corpos lipídicos (setas) e o núcleo são observados. Barra = 2 μ m. Fig. 21B – Vacúolo inteiro em grande aumento. Deposição do produto de reação (seta) associado à membrana do vacúolo (v) e corpos lipídicos no citoplasma (L) são observados. Nota-se a suave invaginação da membrana vacuolar (ponta de seta) durante os primeiros estágios da captação de corpos lipídicos. O aprofundamento da membrana em estágio mais avançado da internalização de estruturas citoplasmáticas também é observado (asterisco). Vesícula aparentemente em formação (estrela) parece apresentar fusão de membrana na região conectada à membrana vacuolar (seta grossa). Barra = 500 nm.

Foram observadas fases iniciais e avançadas no processo de internalização de lipídios. Na figura 22 observam-se detalhes do processo de captação de lipídios. Inicialmente os corpos lipídicos aderem à membrana vacuolar, que apresenta uma leve invaginação (Fig. 22A). Seguem-se o aprofundamento da invaginação e a formação de protusões de membrana que envolvem o material a ser engolfado (Fig. 22B). A fusão da membrana vacuolar e formação de vesícula intravacuolar nas fases finais de internalização é fortemente sugerida nos detalhes das figuras 21B (seta grossa) e 22B (estrela). A vesícula recentemente interiorizada, contendo material lipídico, é observada dentro do vacúolo (Fig. 22B). Alterações no material engolfado incluem a ruptura da membrana da vesícula interiorizada e diversificação de conteúdo de vesículas (Fig. 22C). O conjunto destes resultados sugere a digestão dos lipídios internalizados. Células controle, sem o substrato, exibem semelhante padrão de captação de material citoplasmático (Fig. 22D). Nas células controle, nenhuma deposição de produto de reação foi observado em qualquer estrutura celular ou quaisquer das fases do desenvolvimento monitoradas. Uma vez que na reação citoquímica o cério combina-se ao fosfato inorgânico, formando fosfato de cério, este resultado também indica que não existe quantidade detectável de fosfato livre na célula.

Os vacúolos internalizam outros componentes celulares, além de lipídios, como as vesículas observada na figura 23. A vesícula em formação pode apresentar várias estruturas sendo internalizadas simultaneamente (Fig. 23A), as quais também são observadas em vesículas intravacuolares (Fig. 23B). Na figura 23A evidencia-se nitidamente a unidade de membrana da membrana vacuolar e a associação do produto de reação à sua face interna, que corresponde à membrana vacuolar que está invaginando. Após internalizada, verifica-se a presença do produto de reação associado à face externa da membrana intravacuolar (Fig. 23B). Essa mudança de orientação da deposição do produto de reação mostra claramente que a membrana da vesícula intravacuolar origina-se da invaginação da membrana vacuolar.

Figura 22 - Captação de corpos lipídicos pelos vacúolos do conídio não germinado.

Fig. 22A - Adesão do corpo lipídico (L) à face externa da membrana vacuolar (ponta de seta). Nota-se leve invaginação da membrana na área de contato (seta). Barra = 200 nm.

Fig. 22B - Estágio avançado da internalização de corpo lipídico. Profunda invaginação (seta grossa) e protusões da membrana vacuolar (setas) envolvendo o material a ser engolfado são observadas. Nota-se a vesícula recentemente formada (estrela). Barra = 200 nm.

Fig. 22C - Alterações da vesícula internalizada pelo vacúolo. As vesículas intravacuolares apresentam material diversificado e rupturas nas membranas (setas). Material livre (estrela) no lúmen do vacúolo (v) é observado. Barra = 500 nm.

Fig. 22D - Controle da reação para fosfatase ácida. Não se observa produto de reação em nenhuma estrutura celular. Nota-se a adesão do corpo lipídico (L) à membrana do vacúolo (v). Captação de corpos lipídicos (seta) e material internalizado (seta grossa) que apresenta elétrons de densidade igual à verificada em corpos lipídicos é observada. Barra = 500 nm.

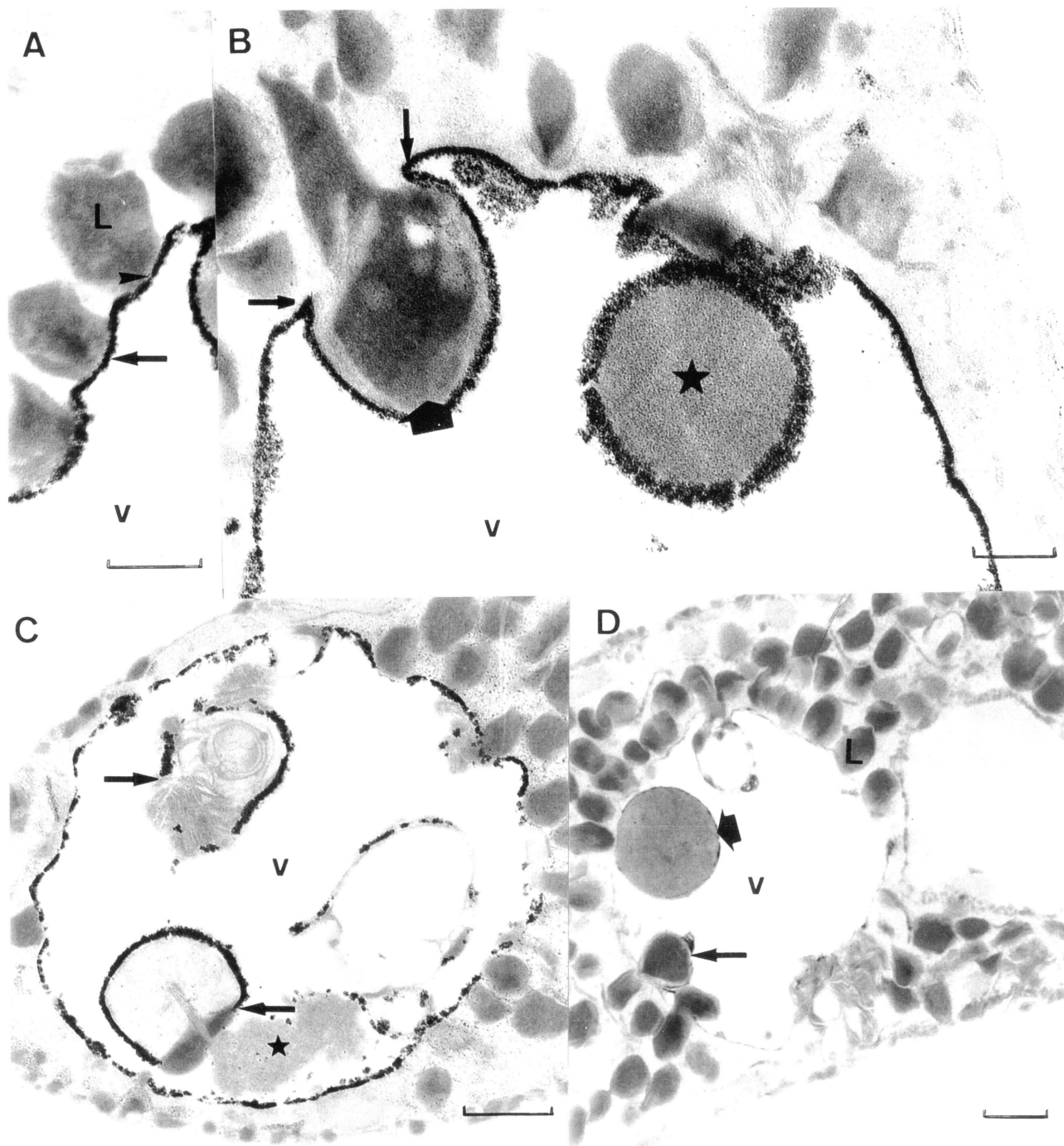


Figura 22 - Captação de corpos lipídicos pelos vacúolos do conídio não germinado.

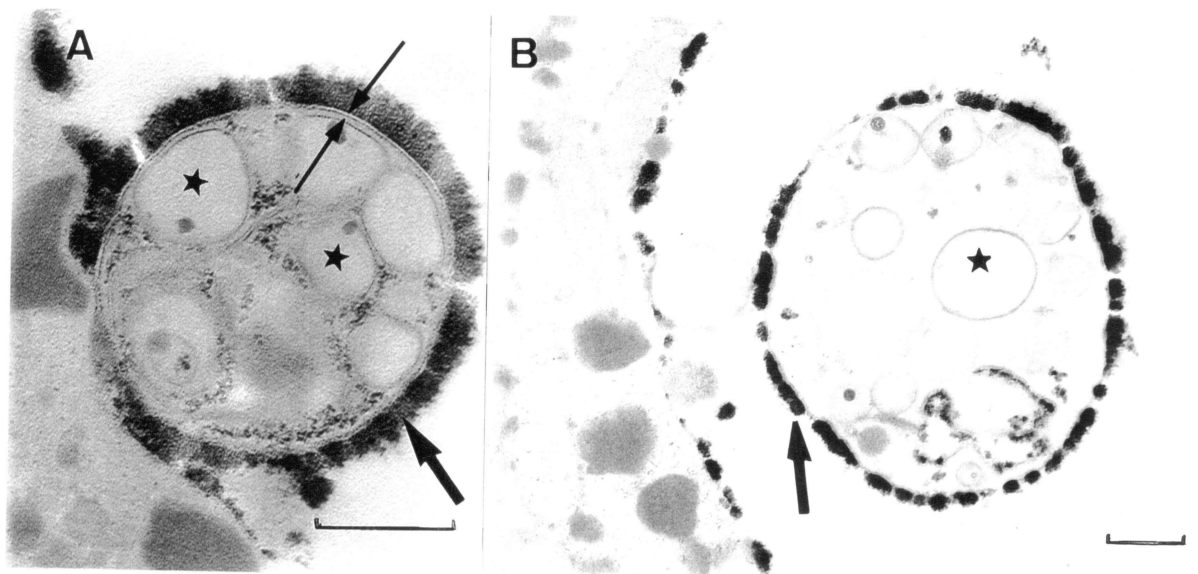


Figura 23 - Internalização de estruturas citoplasmáticas variadas em vacúolos de conídios não germinados.

Fig. 23A - A invaginação da membrana vacuolar captando estruturas delimitadas por membrana (estrelas) é observada. Nota-se a unidade de membrana da membrana vacuolar invaginada (entre setas) com deposição de produto de reação na face luminal da membrana (seta). Barra = 200 nm. Fig. 23B - Vesícula intravacuolar apresentando conteúdo variado. Observa-se a presença de grande número de estruturas membranosas intravesiculares (estrelas). Nota-se a associação do produto de reação (seta) à face externa (vacuolar) da membrana intravesicular. Barra = 200 nm.

5.7.2 Fosfatase ácida durante a germinação

O conídio germinado apresenta grandes vacúolos (Fig. 24). Estes grandes compartimentos, um em cada uma das metades do conídio agora dividido pelo septo, provavelmente resultam do aumento de vacúolos no conídio não germinado (Fig. 21A). Neste

estadio, os vacúolos apresentam acúmulo de produto de reação também no lúmen do compartimento (Fig. 24).

O tubo germinativo também apresenta grandes vacúolos, os quais exibem produto de reação para fosfatase ácida (Fig. 25). O produto de reação está associado à membrana vacuolar e também no lúmen do compartimento, a semelhança do observado no conídio germinado. Imagens sugestivas de microautofagia nestes vacúolos são observadas.

No apressório o produto de reação é observado como densos depósitos no interior das vesículas, bem como associado à membrana vesicular (Figs. 26-27). Estas vesículas são heterogêneas em tamanho e forma e apresentam-se, na maioria das vezes, justapostas aos corpos lipídicos, os quais ocupam extensas áreas de citoplasma. Material lipídico também é observado dentro das vesículas que apresentam o produto de reação da fosfatase ácida (Fig. 27). Partindo do pressuposto que as vesículas do apressório fazem parte do sistema vacuolar do fungo, o qual aparentemente desempenha funções líticas e não biossintéticas, o material lipídico visto no interior da vesícula (Fig. 27) provavelmente foi interiorizado. Entretanto, os dados são insuficientes para determinar o mecanismo de captação dos lipídios pelas vesículas do apressório. É possível que pequenas vesículas contendo fosfatase ácida façam contato inicial com as gotas lipídicas (Fig. 26). A medida que a captação de lipídios e o processo digestivo avançam, as vesículas tornam-se maiores e o produto de reação no interior das mesmas mais disperso. No controle não se observa o produto de reação em nenhuma estrutura celular (Fig. 28).

O produto da fosfatase ácida também é observado em vesículas que parecem sofrer exocitose. Na figura 29 observa-se uma vesícula justaposta à membrana plasmática e parede celular. Na etapa seguinte (Fig. 30) o produto de reação é observado formando uma camada contínua na superfície celular, estando também presente na matriz extracelular.

Figura 24 - Produto da reação da fosfatase ácida no conídio germinado. O conídio germinado exibe um grande vacúolo (v) ocupando a maior parte do volume citoplasmático. O produto de reação está associado à membrana vacuolar (seta grossa) e também presente no lúmen do compartimento (seta). Nota-se as estruturas (estrelas) presentes no compartimento, parecendo restos membranosos. Barra = 1 μm .

Figura 25 - Produto da reação da fosfatase ácida no vacúolo do tubo germinativo. O tubo germinativo em corte transversal apresenta um grande vacúolo (v). O produto de reação está associado à membrana vacuolar (seta) e também presente no lúmen do compartimento (seta grossa). Nota-se a invaginação da membrana sugerindo captação de material citoplasmático (pontas de seta). Barra = 1 μm .

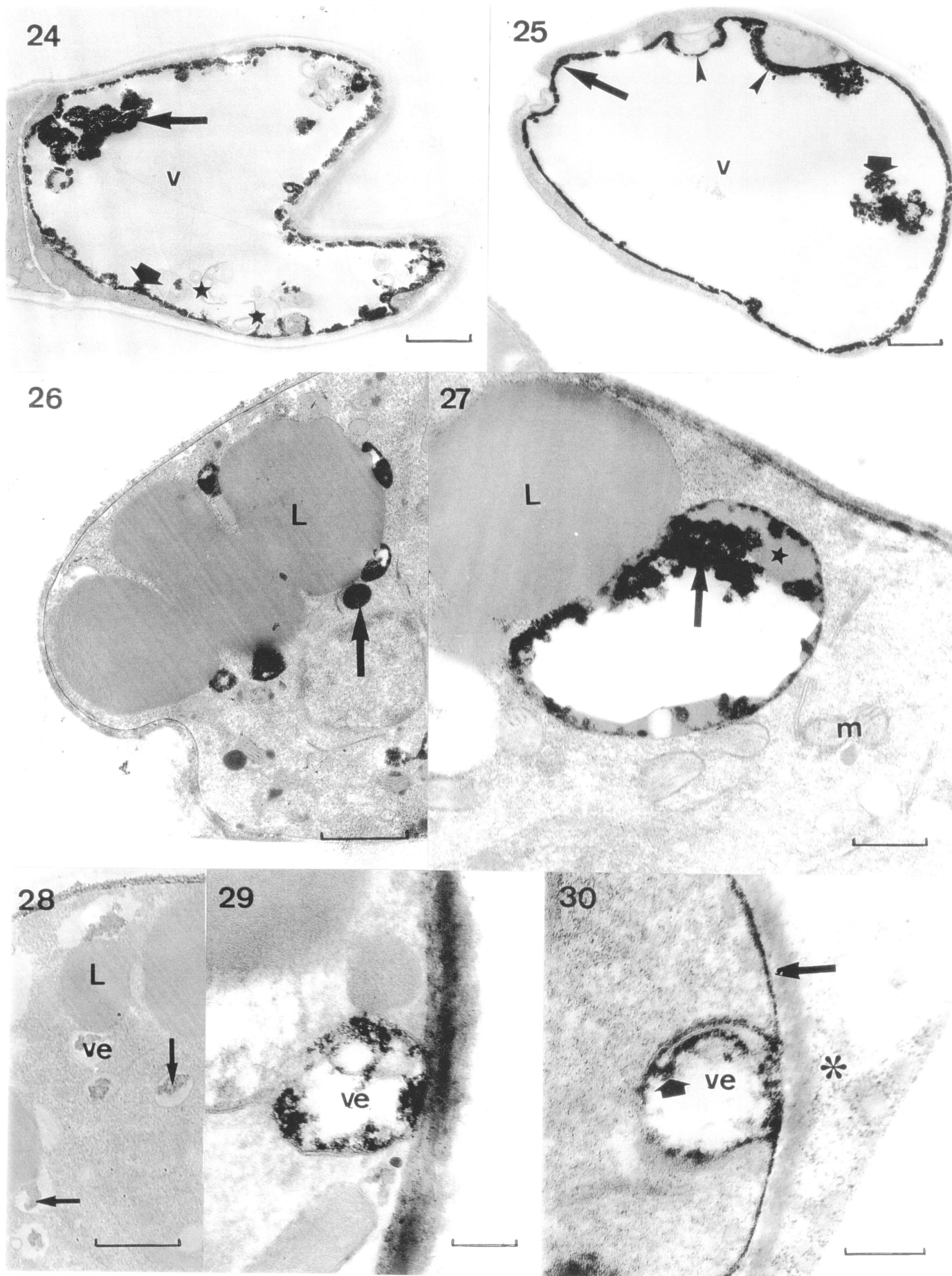
Figura 26 - Produto da reação da fosfatase ácida em vesículas do apressório. O apressório exibe o produto de reação para fosfatase ácida em vesículas justapostas aos corpos lipídicos (seta). Nota-se a proximidade entre estas vesículas e os corpos lipídicos (L). Barra = 1 μm .

Figura 27 - Produto da reação da fosfatase ácida em grande vesícula do apressório. A vesícula está justaposta ao corpo lipídico (L) . O produto de reação (seta) e material lipídico (estrela) são verificados no lúmen do compartimento. Mitocôndrias (m) são observadas nas regiões adjacentes. Barra = 500 nm.

Figura 28 - Controle da reação da fosfatase ácida no apressório. Não se observa produto de reação em nenhuma estrutura celular. Nota-se vesículas (ve) contendo material de baixa elétrton densidade (setas) próximo aos depósitos lipídicos (L). Barra = 1 μm .

Figura 29 - Vesícula (ve) contendo produto da reação da fosfatase ácida justaposta à superfície celular do apressório. A localização da vesícula sugere fortemente etapa inicial de processo secretório. Barra = 200nm.

Figura 30 - Secreção de fosfatase ácida no apressório. O produto de reação da fosfatase ácida (seta grossa) no interior da vesícula (ve) é contínuo com a superfície celular (seta). Nota-se a presença de grânulos do produto de reação na matriz extra-secular (asterisco). Barra = 200nm.



5.8 EFEITO DO FLUORETO SOBRE A FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS

As reações citoquímicas demonstraram a extensiva presença do produto de reação para fosfatase ácida no conídio germinado, tubo germinativo e apressório (Figs. 24-27, 29-30), sugerindo que a mesma tem importante participação no processo germinativo. A fosfatase ácida é uma enzima produtora de fosfato inorgânico. Assim, com objetivo de avaliar o papel desta atividade no processo germinativo, os conídios foram germinados em presença de fluoreto de sódio, inibidor da fosfatase ácida, e em presença de fluoreto de sódio mais fosfato, o seu produto de reação.

A capacidade de formar apressórios foi influenciada pela adição de fluoreto (Fig. 31). Os resultados demonstram que a inibição é dose dependente. O fluoreto inibe em mais de 50% a formação de apressórios na concentração 0,5 mM, aproximando-se de 100% de inibição em 20 mM. Embora as concentrações de fluoreto utilizadas tenham sido elevadas, a quantidade de fluoreto internalizado pelo conídio é desconhecida. Quando o fosfato é adicionado, na concentração de 5 mM a todas as concentrações de NaF utilizadas, verifica-se retorno da capacidade germinativa (Fig. 32). Na concentração de fluoreto 2,5 mM, a formação de apressórios é triplicada. Nas demais concentrações de fluoreto também observa-se o retorno da capacidade germinativa, embora não se obtenha 100% de formação de apressórios.

A determinação da concentração de fosfato utilizada foi feita a partir de uma curva de concentração (2,5; 5; 10 e 20 mM, resultados não mostrados). O fosfato na concentração de 5 mM não afeta a formação de apressórios, quando adicionado ao meio de germinação. A viabilidade celular, nas concentrações de fluoreto utilizadas, foi igual à observada em conídios incubados somente com água (Resultados não mostrados).

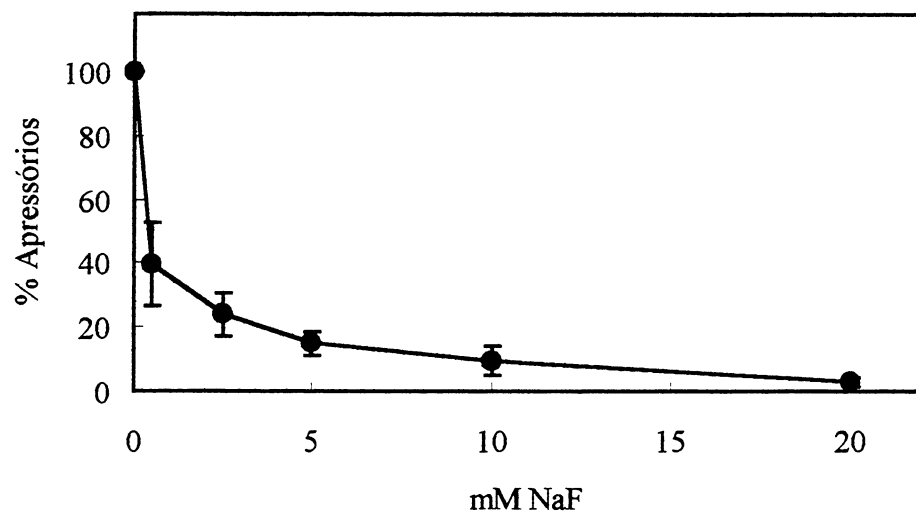


Figura 31 - Efeito do fluoreto sobre a formação de apressórios.

Os conídios foram incubados com fluoreto de sódio em diferentes concentrações, de acordo com a metodologia (item 4.10). Incubação somente com água constituiu controle (100%). As barras representam o desvio padrão de três experimentos em triplicata.

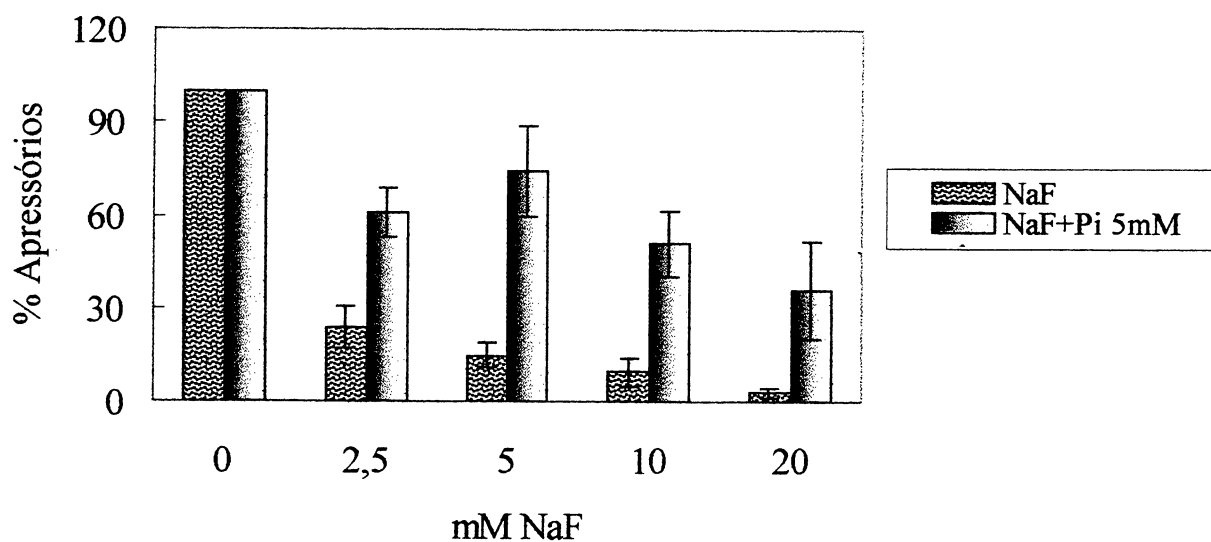


Figura 32 - Reversão da inibição da germinação dos conídios pelo fluoreto de sódio.

Os conídios foram incubados em presença de diferentes concentrações de fluoreto de sódio juntamente com a concentração fixa (5 mM) de fosfato, de acordo com a metodologia (item 4.10). As barras representam o desvio padrão de três experimentos em triplicata.

5.9 A CAPACIDADE DE ENDOCITOSE

No conídio não germinado observa-se figuras sugestiva de endocitose característica (Fig. 33). A continuidade da membrana plasmática e da membrana da vesícula em formação, bem como a formação de um pedúnculo, onde as membranas estão justapostas, indicam que a probabilidade maior é a internalização, e não a exocitose. A utilização de marcadores é necessária para esclarecer devidamente este fenômeno.

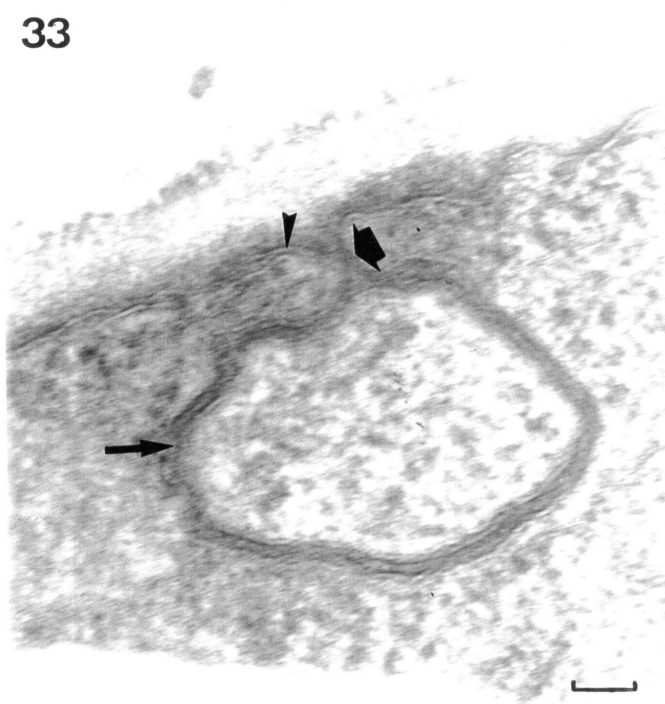


Figura 33 – Provável vesícula endocítica em formação no conídio não germinado.

A membrana plasmática (ponta de seta) é contínua com a membrana da vesícula em formação (seta). Note o pedúnculo (seta grossa) formado entre a membrana plasmática e a vesícula em formação. Barra = 50 nm.

5.10 CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO: A DINÂMICA DOS VACÚOLOS EM CONÍDIOS VIVOS

Os vacúolos dos conídios exibiram o fenômeno de internalização de componentes citoplasmáticos, observados tanto em preparações submetidas à microscopia de luz (Fig. 16) microscopia eletrônica (Figs. 21-23). Nos dois casos, as células foram fixadas e submetidas a diferentes processamentos químicos, produzindo imagens estáticas e que podem levar à interpretações incompletas. Com o objetivo de observar em conídios vivos os eventos relacionados a captação exibida pelos vacúolos, procedeu-se a análise da internalização do vermelho neutro, um corante vital.

O processo de captação do vermelho neutro é extremamente rápido e está representado na figura 34. Após alguns segundos da troca da água pelo corante observa-se pequenas vesículas intravacuolares (Fig. 34B). As vesículas aumentam rapidamente em tamanho e número no interior do vacúolo (Fig. 34E, 34F) e podem fundir-se no interior do mesmo em etapas bem iniciais, (Figs. 34B-34C) ou após passados os primeiros minutos da internalização no vacúolo (Figs. 34F- 34H), formando vesículas maiores. Nesse período também verifica-se a presença de vesículas menores no citoplasma, especialmente associadas à periferia do vacúolo (Fig. 34G), sugerindo sua captação. Estas vesículas não são observadas na periferia celular. Durante os primeiros minutos as vesículas intravacuolares apresentam intenso movimento, dificultando a focalização, como pode ser observado em algumas fotos. Após 15 minutos são verificadas grandes vesículas intravacuolares contendo o corante em 100% dos conídios.

Figura 34 - Dinâmica da captação de vermelho neutro em conídios não germinados. O mesmo conídio foi fotografado em diferentes tempos de contato com o vermelho neutro. Ampliação = 2.095 x.

Fig. 34A - Conídio em água exibindo vacúolos (ponta de seta) sem conteúdo aparente. Os vacúolos 1 e 2 serão observados nas próximas micrografias.

Fig. 34B - Conídio após poucos segundos em contato com o vermelho neutro. Neste estágio observa-se duas pequenas vesículas coradas (pontas de seta) no interior do vacúolo 1 e uma vesícula (ponta de seta) no interior do vacúolo 2.

Fig. 34C - Fusão das duas vesículas do vacúolo 1 (ponta de seta). Observa-se agora somente uma vesícula neste vacúolo.

Fig. 34D - Após alguns minutos observa-se o aumento das vesículas intravacuolares e as granulações citoplasmáticas próximas aos vacúolos (ponta de seta) tornam-se mais evidentes.

Fig. 34E - Observa-se a presença de duas vesículas no vacúolo 2 (pontas de seta).

Fig. 34F - Vesículas do vacúolo 2 mais próximas (pontas de seta). No vacúolo 1 observam-se duas vesículas.

Fig. 34G - Micrografia do instante exato da fusão (seta) das vesículas do vacúolo 2. Observam-se várias pequenas vesículas nas margens do vacúolo 1 (pontas de setas).

Fig. 34H - Instante seguinte à fusão documentada na figura anterior. Nota-se a presença de somente uma grande vesícula no vacúolo 2 (seta).

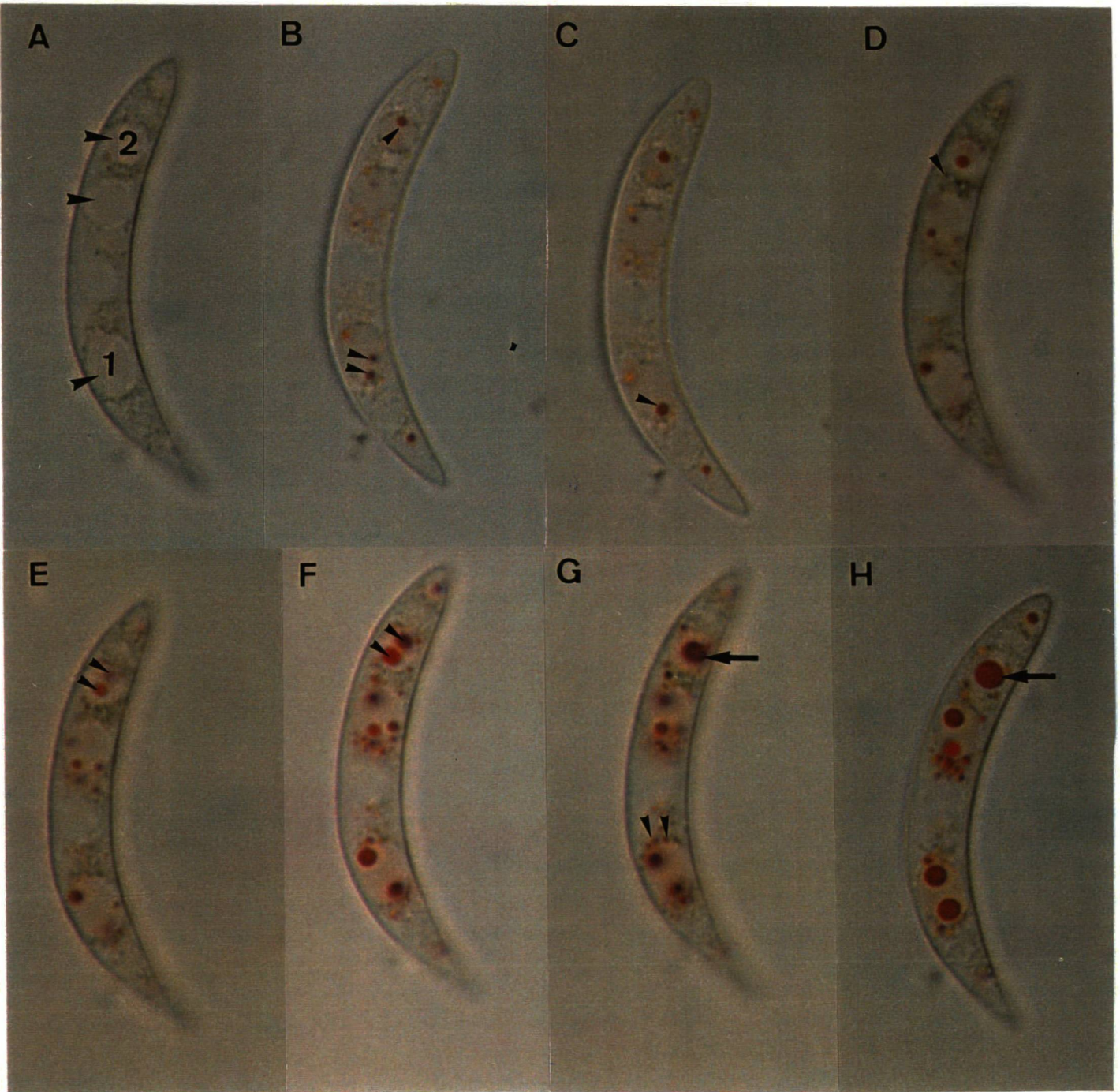


Figura 34 - Dinâmica da captação de vermelho neutro em conídios não germinados.

Figura 35 - Captação do vermelho neutro em conídios germinados. Ampliação = 2.095 x.

Fig. 35A – Vesículas contendo vermelho neutro (ponta de seta) são observadas dentro de vacúolos do conídio germinado (Cg).

Fig. 35B - Vesículas contendo vermelho neutro (ponta de seta) são observadas dentro de vacúolos do conídio germinado (Cg) e tubo germinativo (Tg)

Fig. 35C - Observam-se vesículas contendo vermelho neutro em somente uma das metades do conídios germinado (ponta de seta). Observa-se a delimitação do vacúolo (seta)

Após 16 horas de germinação os vacúolos no conídio germinado ainda são capazes de internalizar vermelho neutro (Fig. 35A). Os vacúolos do tubo germinativo também exibem esta capacidade (Fig. 35B). Estes resultados demonstram que atividade vacuolar ainda está presente nestas células. Eventualmente verifica-se a captação somente em uma das metades do conídio (Fig. 35C), sugerindo que a outra já tenha sofrido morte celular.

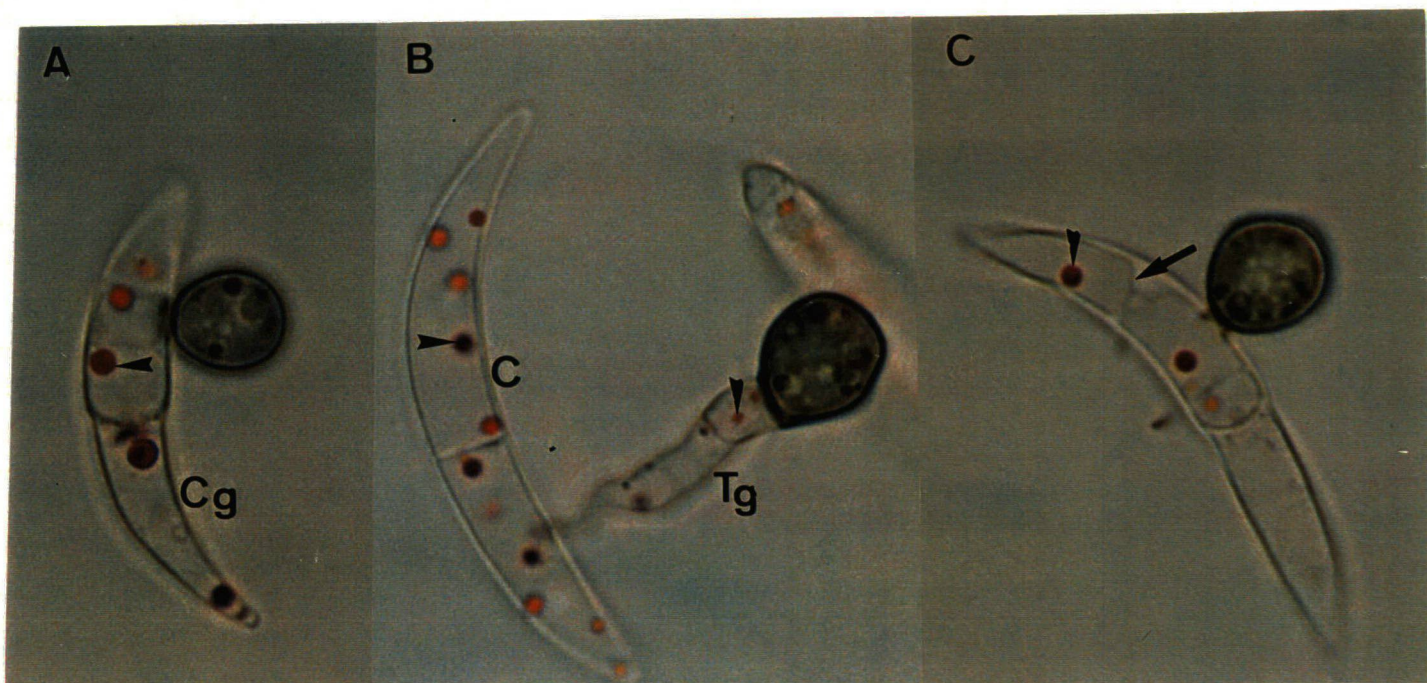


Figura 35 - Captação do vermelho neutro em conídios germinado

5.11 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DA FRAÇÃO MICOSPORINA

Vários métodos extrativos foram testados, sendo que a extração metanólica apresentou os melhores resultados. A metodologia padronizada está descrita na página 42. Este tipo de extração é um método utilizado de longa data na extração de micosporinas (Trione & Leach, 1969; Bouillant *et al.*, 1981; Buscot & Bernillon, 1991). Uma das vantagens do uso de metanol é o fato ser um solvente de baixa reatividade. As diferentes etapas do processo extrativo foram monitoradas através do espectro do UV e visível, na faixa de 200-500 nm. As reextrações com acetona foram eficientes na remoção dos pigmentos extraídos pelo metanol. Além disso, o uso de solventes apolares para a remoção de lipídios nos processos extrativos de micosporinas tem sido utilizado (Fayret & Vito, 1981; Grant *et al.*, 1985).

A fração aquosa final da extração metanólica foi submetida à cromatografia de troca iônica. Foram testadas as resinas trocadoras de ânions Dowex-1 e DEAE-Sephadex A-50, em colunas e no modo em batelada. A resina DEAE-Sephadex A-50, eluída com NaCl 1,5 mM no modo em batelada, mostrou-se mais eficiente, produzindo picos definidos, além de rendimento e rapidez maiores. Assim, optou-se por este modo de separação. As frações eluídas com 1,5 mM foram coletadas, rotoevaporadas e submetidas à coluna de Sephacryl S-200. O espectro de absorção no ultravioleta e visível das frações obtidas nesta coluna (Fig. 36) é característico de micosporinas (Trione & Leach, 1969). Apresenta um pico simétrico com absorção máxima em 313 nm e é praticamente idêntico ao da micosporina-glutamina purificada de *Ascochyta fabae* (Pittet *et al.*, 1983b). Essa fração foi denominada de fração micosporina. As frações negativas para o teste do cloreto foram juntadas e posteriormente submetidas às análises de HPLC, espectroscópicas e ensaios biológicos.

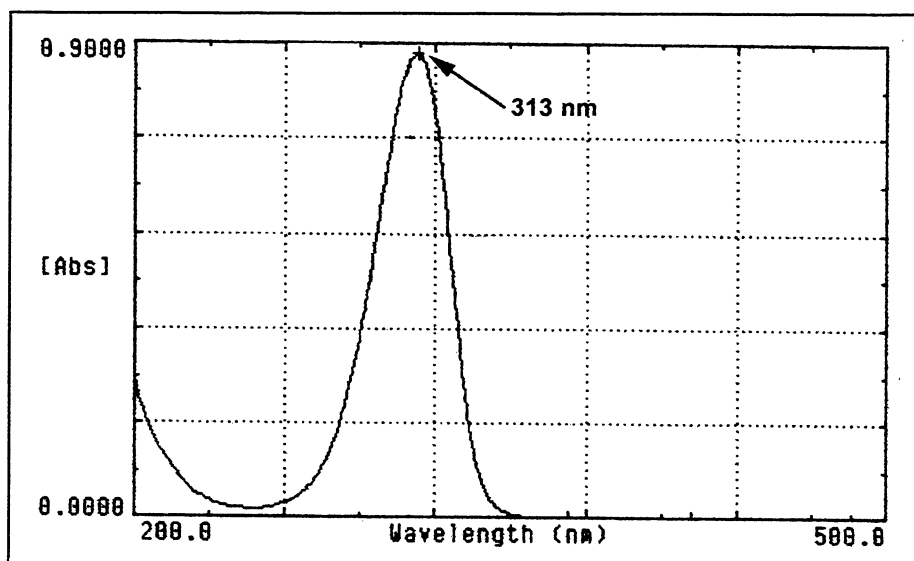


Figura 36 - Espectro de absorção no ultravioleta e visível (200-500 nm) de fração eluída em Sephacryl S-200. Absorção máxima = 313 nm.

O grau de pureza da fração obtida foi monitorado por HPLC e HPSEC-MALLS. O cromatograma obtido pelas análises de HPLC está mostrado na figura 37. Quando monitorado em 313 nm (Fig. 37A), o pico principal, correspondendo a 99,3 % da amostra, apresentou-se alargado, com um ombro esquerdo, sugerindo a presença de dois ou mais compostos. Além destes, outros em menor concentração, absorvendo em 313 nm, foram observados. A corrida no HPLC também foi monitorada em 254 nm (Fig. 37B). Observaram-se picos maiores coincidentes com os tempos de retenção em 313 nm e outros menores ao longo do cromatograma. Estes resultados demonstram que a fração micosporina é heterogênea, apresentando mais de uma forma de micosporina e/ou contaminates. A corrida também foi acompanhada em 280 nm (resultados não mostrados). Os picos observados foram coincidentes com os tempos de eluição das frações absorvendo em 313 nm.

A amostra também foi analisada através de cromatografia de gel permeação por exclusão estérica (HPSEC-MALLS) acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração. O perfil de eluição está mostrado na figura 38, e demonstra a eluição do (s) componente (s) da amostra em um só pico. O tempo de eluição é compatível com a baixa massa molecular de micosporinas (60 minutos) e é próximo ao dos componentes do solvente de eluição (NaNO_3 , NaN_3), embora nitidamente separado (68 minutos). Estes resultados sugerem a ausência de compostos de elevado peso molecular na fração micosporina. Entretanto, não indicam, com precisão, o grau de pureza para este tipo de amostra, uma vez que através das análises de HPLC (Fig 37), observou-se que a amostra não é pura. A heterogeneidade também foi posteriormente confirmada pelas análises de RMN (Figs. 42-43).

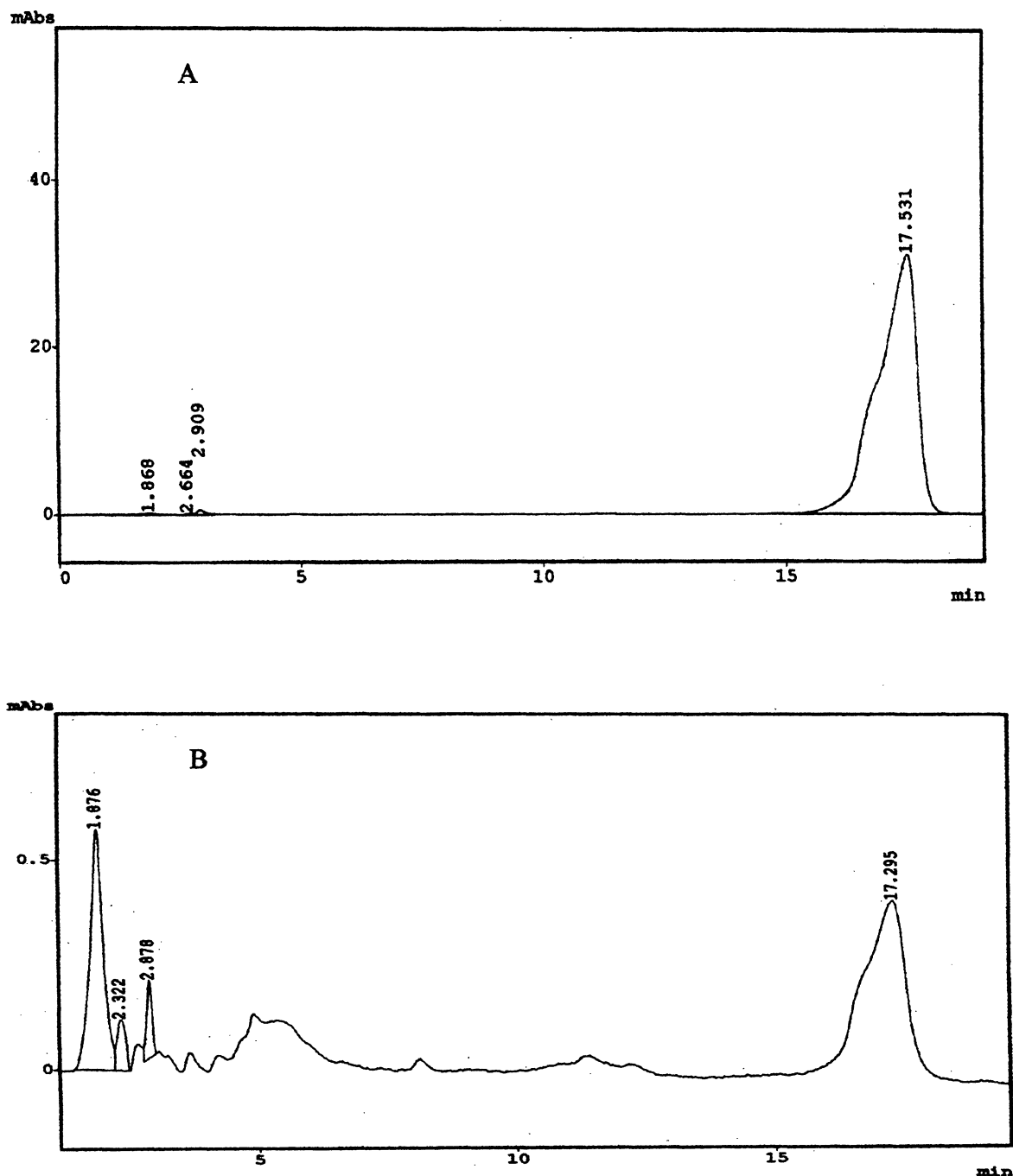


Figura 37 - Perfis de eluição em HPLC da fração micospolina. A - O pico principal, com tempo de retenção 17,5 min, corresponde à 99,3 % da concentração total e apresenta um ombro esquerdo que sugere a presença de dois componentes. Os picos com 1,8, 2,6 e 2,9 minutos de retenção, representam 0,6 % da concentração total. B - Observa-se a corrida com detecção em 254 nm. Verificam-se picos com tempos de retenção iguais e diferentes dos observados com detecção em 313 nm, indicando a presença de outros compostos na fração.

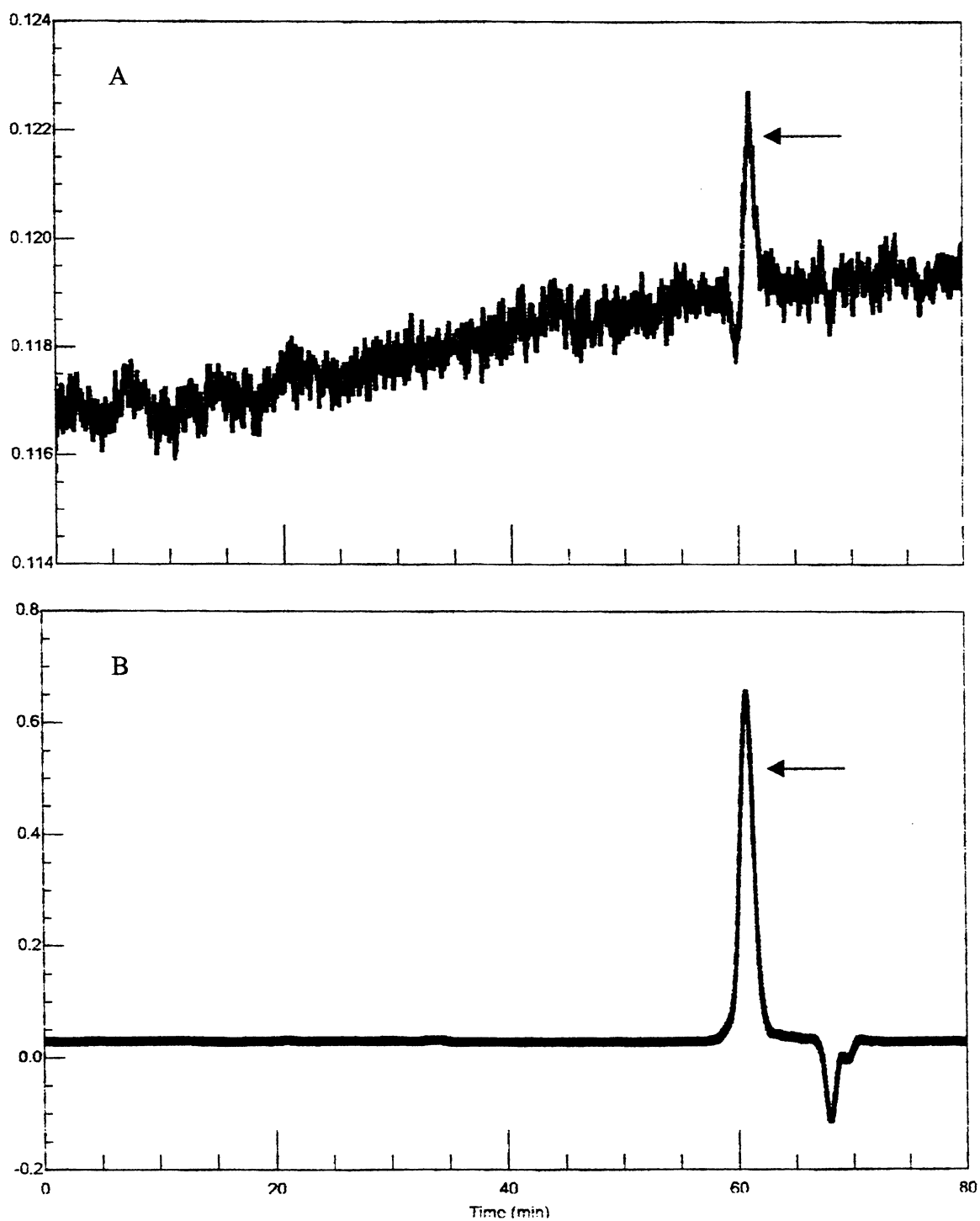
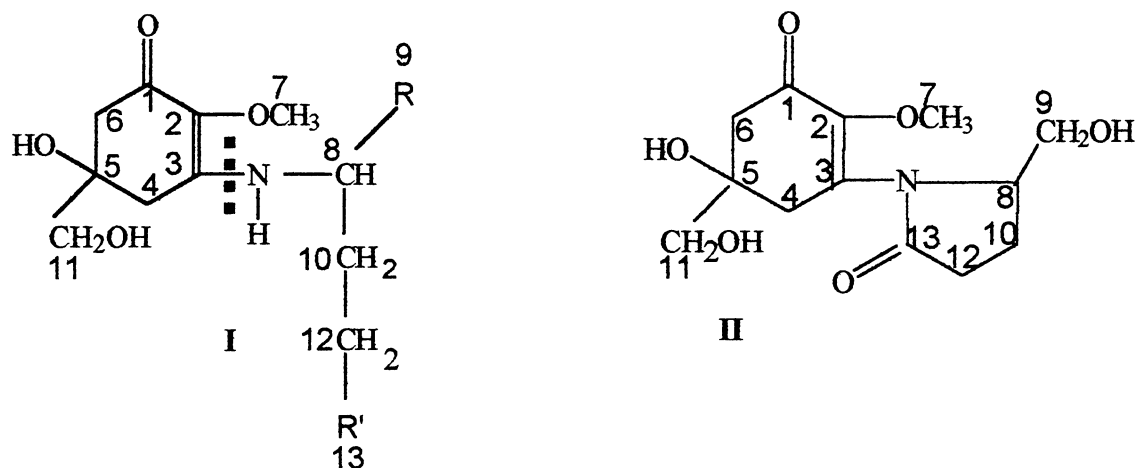


Figura 38 - Perfis da eluição de cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS). Observam-se dois picos coincidentes (setas) evidenciados pelos detectores de espalhamento de luz (A) e índice de refração (B).

5.12 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTRUTURA DA FRAÇÃO MICOSPORINA

A fim de facilitar a apresentação e interpretação dos próximos resultados, abaixo estão descritas as estruturas das principais formas de micosporinas derivadas de ácido glutâmico.



I	R	R'	PM
Micosporina-ácido glutâmico	-COOH	-COOH	317,08
Micosporina-glutamicol	-CH ₂ OH	-COOH	303,10
Micosporina-glutamina	-COOH	-CONH ₂	316,12
Micosporina-glutaminol	-CH ₂ OH	-CONH ₂	302,11

Figura 39 - Estrutura química das principais micosporinas derivadas de ácido glutâmico.

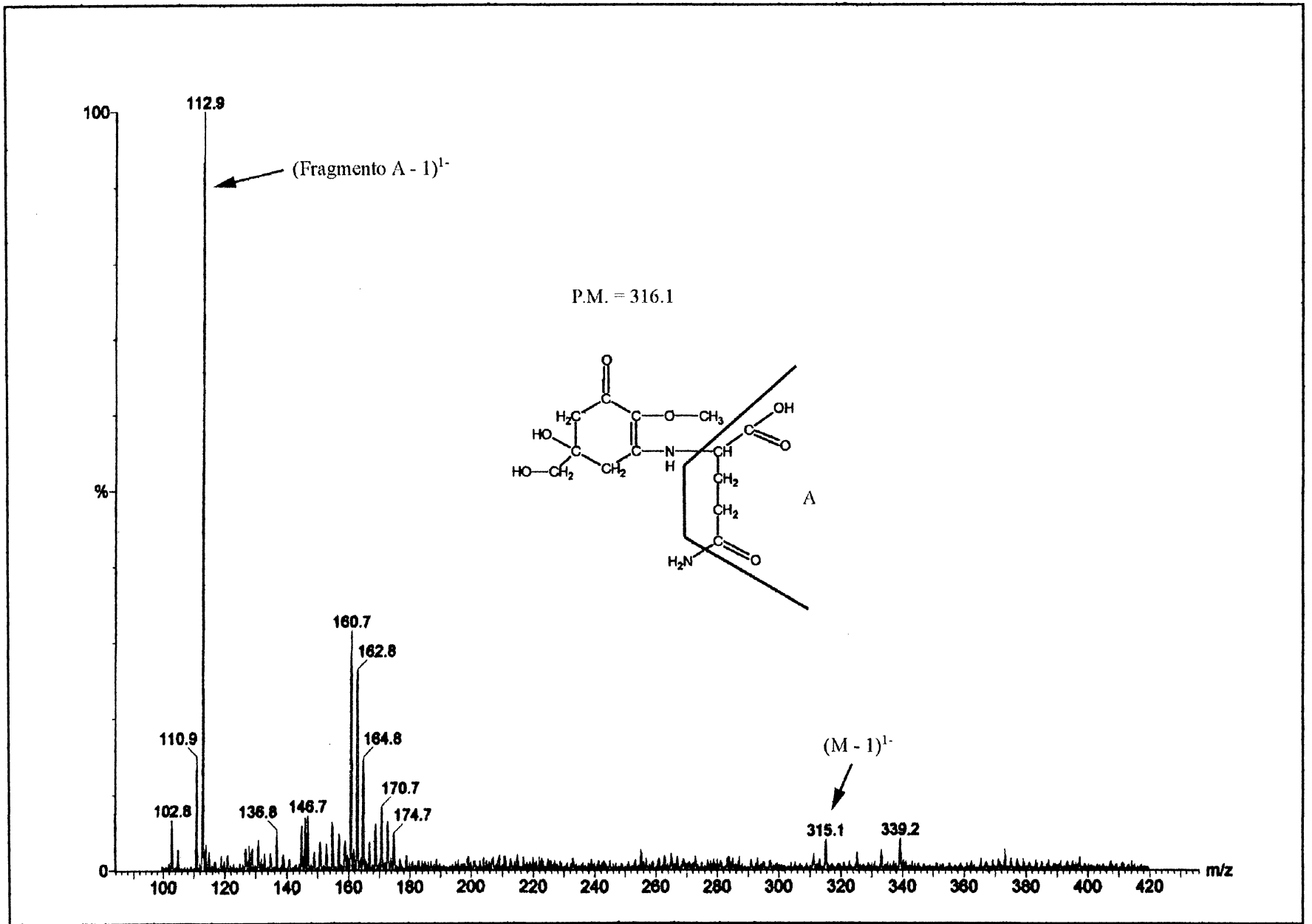
Em I observam-se as estruturas com radical de cadeia aberta. Em II radical com cadeia cíclica (micosporina-ácido piroglutâmico reduzido). Em I, à esquerda da linha tracejada, encontra-se o anel ciclohexanona substituído e à direita, o aminoácido ligado, que na maioria dos casos, são derivados do ácido glutâmico. Referências: Arpin *et al.*, 1977; Young & Patterson, (1982); Pittet *et al.*, (1983a); Leymone *et al.*, (1985).

Outros detalhes sobre a estrutura das micosporinas estão descritos na tabela 1, pg. 25; a tabela 2, pg. 27, apresenta a estrutura da maioria das micosporinas conhecidas. Em relação à nomenclatura utilizada pelos autores, a micosporina-glutaminol também é referida como micosporina-ácido glutâmico reduzido.

5.12.1 Espectrometria de massa - ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry)

No presente trabalho, o espectro no UV e visível (Fig. 36) sugere a presença de micosporina na fração isolada. Esta fração, quando submetida a análises de ESI-MS no modo negativo (Fig. 40), mostrou o pico do íon molecular m/z 315,1 que corresponde à massa molecular da micosporina-glutamina, 316,1 menos um hidrogênio. O pico de maior intensidade, m/z 112,9, pode corresponder ao fragmento mostrado na figura 40. No modo positivo observou-se o pico do íon molecular m/z 361,4 (Fig. 41) que corresponde à micosporina glutamina, com a carboxila ionizada, mais dois átomos de sódio. Em ambas as análises observaram-se vários picos ao longo do espectro que podem corresponder a contaminantes, uma vez que a fração apresenta-se heterogênea, conforme demonstrado pelas análises de HPLC (Fig 37).

Figura 40 - Espectrometria de massa (ESI-MS), no modo negativo, da fração micospolina.



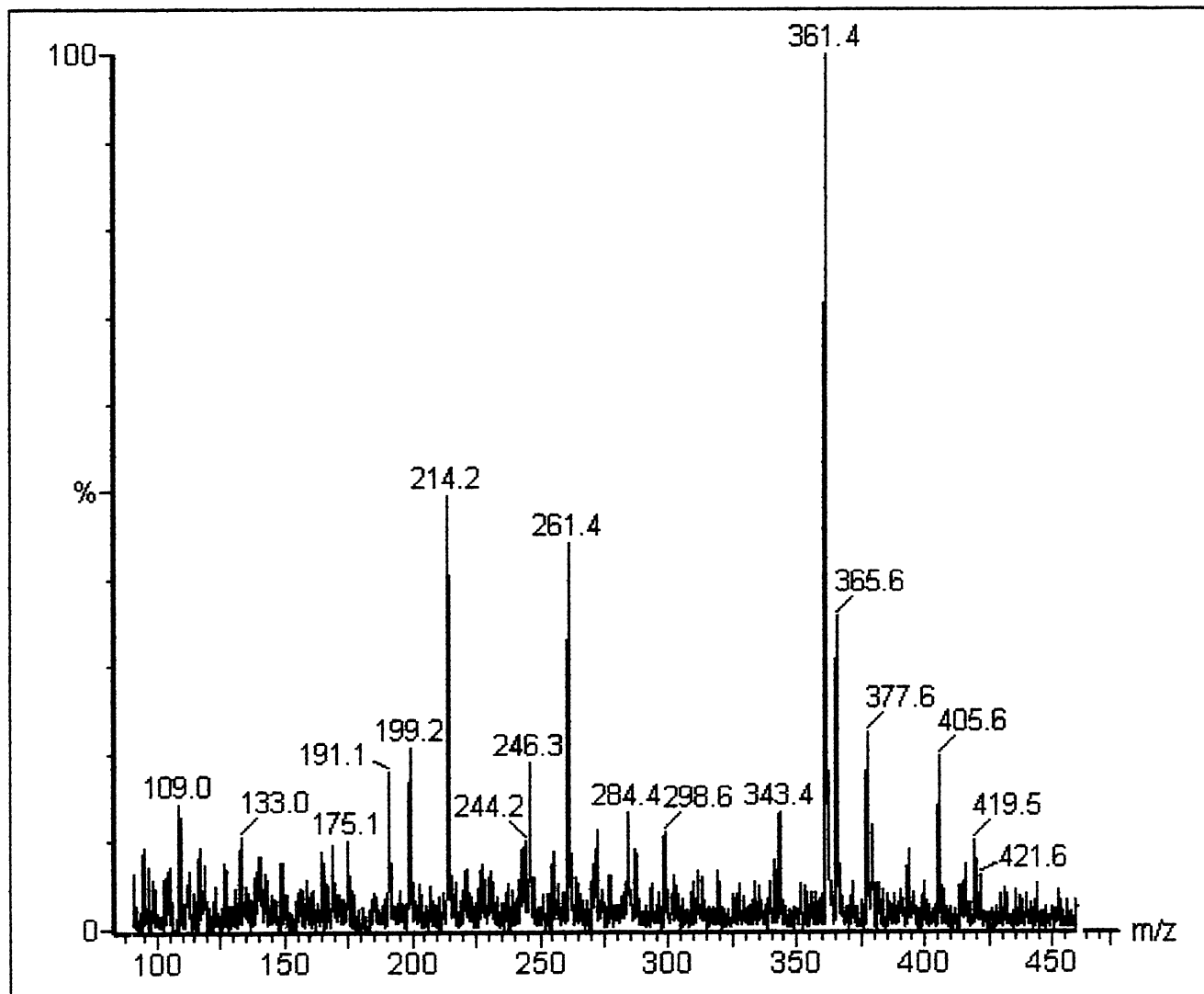


Figura 41 - Espectro de espectrometria massa, ESI-MS no modo positivo, da fração micosporina.

5.12.2 Análises monodimensionais e bidimensionais de RMN da fração micosporina

O espectro no UV e visível da fração micosporina é característico desta classe de compostos, sugerindo que micosporina (s) apresenta (m)-se em elevada concentração nesta fração. Entretanto, no espectro de ^1H -RMN (Fig. 42) ou ^{13}C -RMN (Fig. 43) verificou-se a presença de sinais excedentes, em relação ao esperado, caso a amostra fosse pura e apresentasse somente uma micosporina. Estes espectros confirmam a presença de mais de uma micosporina e/ou contaminantes na fração obtida, sugerida pelas análises de HPLC (Fig. 37). Dentro deste contexto, e levando em consideração os resultados de ESI-MS, é somente possível verificar sinais compatíveis com átomos de hidrogênios e carbonos de grupamentos presentes em micosporinas, e sugerir, em uma análise muito preliminar, os assinalamentos dos carbonos e hidrogênios do provável composto em maior concentração. Não se pretende uma caracterização conclusiva ou definitiva.

Na interpretação dos resultados, além da comparação com os dados de disponíveis na literatura, efetuou-se a simulação dos espectros através de consulta, via Internet, à Advanced Chemistry Development Labs (<http://www.acdlabs.com>), programas HNMR Predictor e CNMR Predictor. Não foi possível a comparação com os espectros de ^1H -RMN ou ^{13}C -RMN de outras micosporinas já caracterizadas, pois os mesmos não são mostrados nos trabalhos, sendo somente os deslocamentos químicos relatados ao longo do texto ou na forma de tabelas (Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Arpin *et al.*, 1977; Young & Patterson, 1982; Pittet *et al.*, 1983a). Para fins de comparação em ^1H -RMN, serão utilizados principalmente os assinalamentos para micosporina-ácido glutâmico, micosporina isolada de *G. cingulata* cujas análises foram efetuadas em D_2O (Young & Patterson, 1982). Nas análises de ^{13}C -RMN, os resultados serão comparados com os dados descritos na literatura para micosporinas derivadas de ácido

glutâmico, conforme a tabela 3 (pg. 105), e com os deslocamentos obtidos de espectros simulados para micospolina-ácido glutâmico e micospolina-glutamina.

Na apresentação dos resultados, inicialmente será feita uma análise preliminar dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$, complementada com as análises de HMQC que, por sua vez, foi analisada juntamente com os demais experimentos bidimensionais. Em um segundo momento, as análises bidimensionais serão detalhadas individualmente.

A análise preliminar dos espectros dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ (Fig. 42) e $^{13}\text{C-RMN}$ (Fig. 43), amparada nas análises de HMQC (Figs. 46-47), sugerem a presença dos seguintes grupamentos presentes em micospolinas:

a) $-\text{CH}_2-$

Os sinais verificados no espectro de $^1\text{H-RMN}$ entre δ 2,08-2,15 (Fig. 42, região I), entre δ 2,3-2,6 (Fig. 42, região II) e entre δ 2,6-2,7 (Fig. 42, região III) apresentam deslocamentos químicos compatíveis com $-\text{CH}_2-$ quando comparados com os deslocamentos atribuídos classicamente ao metileno (Silverstein *et al.*, 1994; Crews *et al.*, 1998) e também próximos aos atribuídos à micospolina-ácido glutâmico (Young & Patterson, 1982). Os autores atribuem ao H-4 δ 2,36 e δ 2,65; ao H-6 δ 2,68 e δ 2,72; ao H-10 δ 2,17 e δ 2,09 e ao H-12 δ 2,39. Como será descrito a seguir, a análise de HMQC sugere deslocamentos próximos a estes para estas posições.

No espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (Fig. 43), a região I apresenta deslocamentos químicos característicos de $-\text{CH}_2-$. Após análise de HMQC (Fig. 46) observaram-se acoplamentos entre δ 33,8 (C-4) e δ 2,38 (H-4); δ 27,37 (C-10) e δ 2,1 e δ 2,05 (H-10); δ 31,79 (C-12) e δ 2,44 (H-12). Estes assinalamentos estão também fundamentados nas demais correlações (Tabela 4, pg. 108; Fig. 45). Os assinalamentos atribuídos aos carbonos são próximos aos atribuídos a outras micospolinas (Tabela 3, pg. 105, linhas A-E) e compatíveis com a literatura técnica (Crews *et al.*, 1998). A região II apresenta o sinal δ 43,29, característico de $-\text{CH}_2-$ ligado a

carbono de carbonila de cetona em diferentes cadeias. Por exemplo, ao C-6 do anel ciclohexanona atribui-se δ 41,9 (Crews *et al.*, 1998). Após análise de HMQC (Fig. 46), observou-se δ 43,51 (C-6) acoplado com δ 2,37 e δ 2,67 (H-6). O deslocamento atribuído a este carbono é muito próximo aos descritos para o C-6 de diferentes micosporinas (Tabela 3, pg. 105) e para micosporina-glutamina (Fig. 44) e micosporina-ácido glutâmico (CNMR Predictor) às quais atribuí-se δ 41,81 (limite de confiabilidade = 4,4).

b) -O-CH₃- e -CH₂-OH

No espectro de ¹H-RMN observam-se os sinais δ 3,54 e δ 3,62 (Fig. 42, região IV), compatíveis com estes grupos funcionais (Cooper, 1980; Silverstein *et al.*, 1994; Crews *et al.*, 1998). Os valores são também próximos aos assinalamentos atribuídos a estes grupamentos em micosporina-ácido glutâmico (Young & Patterson, 1982) e à porção ciclohexanona da micosporina-glicina, extraída da alga *C. yendoi* (Tsujino *et al.*, 1978). Ao grupo -CH₂-OH, e ao grupo O-CH₃, posições 11 e 7 do anel ciclohexanona (Vide Fig. 39, pg. 92), Young & Patterson (1982) assinalam δ 3,51 e δ 3,59 e Tsujino *et al.* (1978) assinalam δ 3,58 e δ 3,55, respectivamente. Após as análises de HMQC (Fig. 47) observaram-se os acoplamentos, descritos no próximo parágrafo, que ajudam a elucidar estas posições.

Na região III do espectro de ¹³C-RMN (Fig. 43) são verificados deslocamentos químicos característicos de -O-CH₃. Após as análises de HMQC (Fig. 47) foi observado o acoplamento entre δ 59,71 e δ 3,61, que pôde ser atribuído à C-7 e H-7. O assinalamento δ 59,71 é próximo aos atribuídos ao C-7 de algumas micosporinas (Tabela 3, pg. 105, linhas A-C) e aos observados nos espectros simulados da micosporina-ácido glutâmico e micosporina-glutamina, sendo atribuído à ambos δ 57,33 (CNMR Predictor, Fig. 44). Ao -O-CH₃ atribui-se, na literatura clássica, deslocamentos que variam de δ 53-61 (Crews *et al.*, 1998) e δ 50-60 (Cooper, 1980).

Deslocamento característicos de carbono ligado a hidroxila estão presentes na região IV do espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 43). Após as análises de HMQC (Fig. 47) foi observado o acoplamento entre δ 68,82 e δ 3,55, atribuídos a C-11 e H-11. O deslocamento δ 68,82 é próximo aos assinalamentos em micosporinas (Tabela 3, pg-105, linha F) e ao assinalamento atribuído a C-11 em micosporina-glutamina (Fig. 44). O assinalamento atribuído ao C-5, δ 74,29, baseou-se somente no espectro de ^{13}C -RMN e é compatível com os assinalamentos atribuídos a este carbono em outras micosporinas (Tabela 3, linhas A-E) e em espectro simulado da micosporina-glutamina (Fig. 44).

c) -CH-NH-

No espectro de ^1H -RMN o sinal em δ 3,7 (Fig. 42, região V) apresenta valores próximos aos observados em simulação do espectro da micosporina-glutamina, no qual atribui a esta posição δ 3,5, enquanto nos espectros das micosporinas com radical ácido glutâmico, piroglutâmico ou alanina fica na faixa de δ 4,2-4,6 (HNMR Predictor, espectros não mostrados). Da mesma forma, atribui-se a esta posição, em micosporina-ácido glutâmico δ 4,07 (Young & Patterson, 1982) e em micosporina-glicina δ 4,02 (Tsuji *et al.*, 1978). Após as análises bidimensionais (Tabela 4, pg. 108, Fig. 45) este sinal pôde ser atribuído ao C-8.

No espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 43) observam-se, na região III, deslocamentos compatíveis com -CH-NH-R (Cooper, 1980; Crews *et al.*, 1998). Após análise de HMQC, COSY e TOCSY (Tabela 4, pg. 108, Fig. 45), encontrou-se acoplamento entre δ 55,15 e δ 3,77, compatível com C-8 e H-8. O assinalamento deste carbono situa-se dentro da faixa sugerida em algumas micosporinas (Tabela 3, pg.105, linha A) e aos atribuídos em espectro simulado para micosporina-ácido glutâmico, δ 52,83 - limite de confiabilidade = 2,4 (CNMR Predictor) e micosporina-glutamina, δ 52,75 - limite de confiabilidade = 2,7 (Fig. 44).

Também encontra-se dentro da faixa relatada na literatura técnica, como deslocamentos entre δ 50-70 (Cooper, 1980).

Os carbonos de carbonila e carbonos com dupla ligação, os quais não foram detectados no espectro de ^{13}C -RMN, provavelmente devido a quantidade insuficiente de amostra, foram assinalados na correlação HMBC (Figs. 48, 49, Tabela 4, pg. 108) e encontram-se listados na linha F da tabela 3. Observam-se os assinalamentos δ 186,96 (C-1), δ 131,22 (C-2), δ 175,18 (C-9) e δ 179,31 (C-13). Além disso, bandas de absorção compatíveis com estes grupamentos foram detectadas nas análises de FTIR (Fig. 52). Não foram assinalados nas correlações de HMQC, uma vez que não apresentam prótons ligados, como seria o caso de uma carbonila de aldeído. Os assinalamentos destes carbonos, descritos na literatura, não estão perfeitamente claros. Os deslocamentos atribuídos por Young & Patterson (1982), da forma como foram listados no texto, deixam margem para dúvidas sobre suas correspondências com C-1, C-3 e C-13 (Tabela 3, pg. 105, linhas A e E), enquanto Arpin *et al.*, (1977) deixam clara a sua dúvida sobre os assinalamentos encontrados para os carbonos C-1 e C-13 (Tabela 3, pg. 105, linhas A e E). Independente destas incertezas, os assinalamentos atribuídos a estes carbonos, no presente trabalho, ficam próximos aos atribuídos em micosporinas e aos descritos na literatura clássica (Tabela 3, Cooper, 1980; Silverstein *et al.*, 1994; Crews *et al.*, 1998). O assinalamento atribuído à C-9 é compatível com o atribuído em espectros simulados à micosporina-ácido glutâmico, δ 176,69 - limite de confiabilidade = 2,3 (CNMR Predictor) e à micosporina glutamina, δ 174,62 - limite de confiabilidade 2,3 (Fig. 44). Foram encontradas dificuldades de análise no assinalamento de C-3, pois nas regiões dos espectros de HMBC, correspondentes aos assinalamentos destes carbonos reportados na literatura, observou-se a produção de artefatos, provavelmente devido a quantidade da amostra. Dessa maneira, optou-se por não definir este assinalamento.

Pelo acima exposto, e considerando os espectros de ESI-MS (Figs.40-41) e de UV e visível (Fig. 36), é possível sugerir a presença de micosporina (s) na amostra. Os sinais excedentes nos espectros de ^1H -RMN (Fig. 42) e ^{13}C -RMN (Fig. 43), provavelmente devem-se à presença dos contaminantes na amostra analisada, sendo também possível a presença de mais de uma micosporina na preparação, em concentrações mais baixas, conforme as análises de HPLC (Fig. 37).

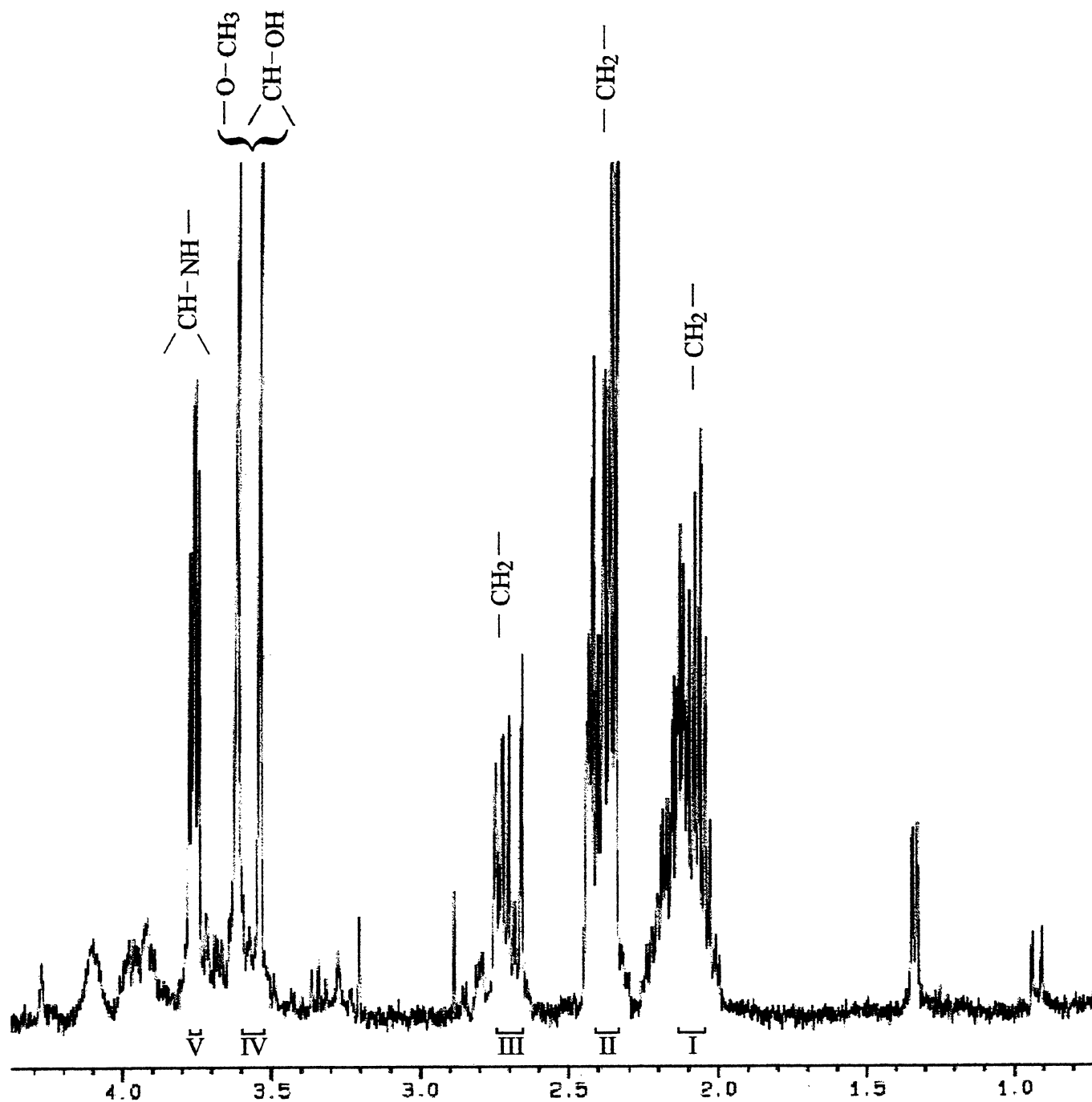


Figura 42 - Espectro de ^1H -RMN da fração microsporina, em D_2O , 30°C . Os deslocamentos estão expressos em δ ppm. As regiões contendo sinais para átomos de hidrogênio de grupos presentes em microsporinas estão evidenciadas.

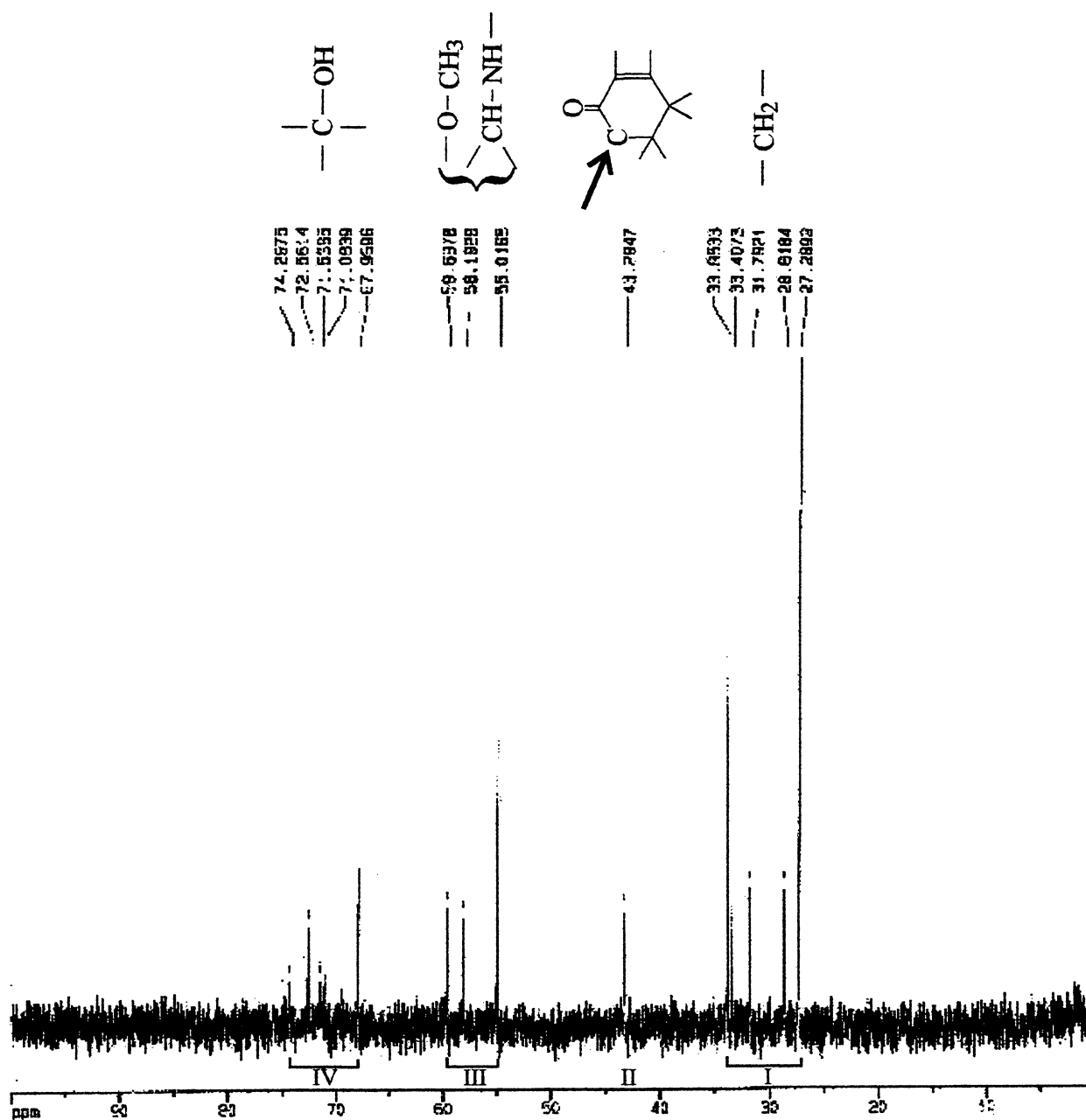


Figura 43 - Espectro de ^{13}C -RMN da fração micosporina, em D_2O , a 30°C . Os deslocamentos estão expressos em δ ppm. As regiões contendo sinais para átomos de carbono de grupos presentes em micosporinas estão evidenciadas.

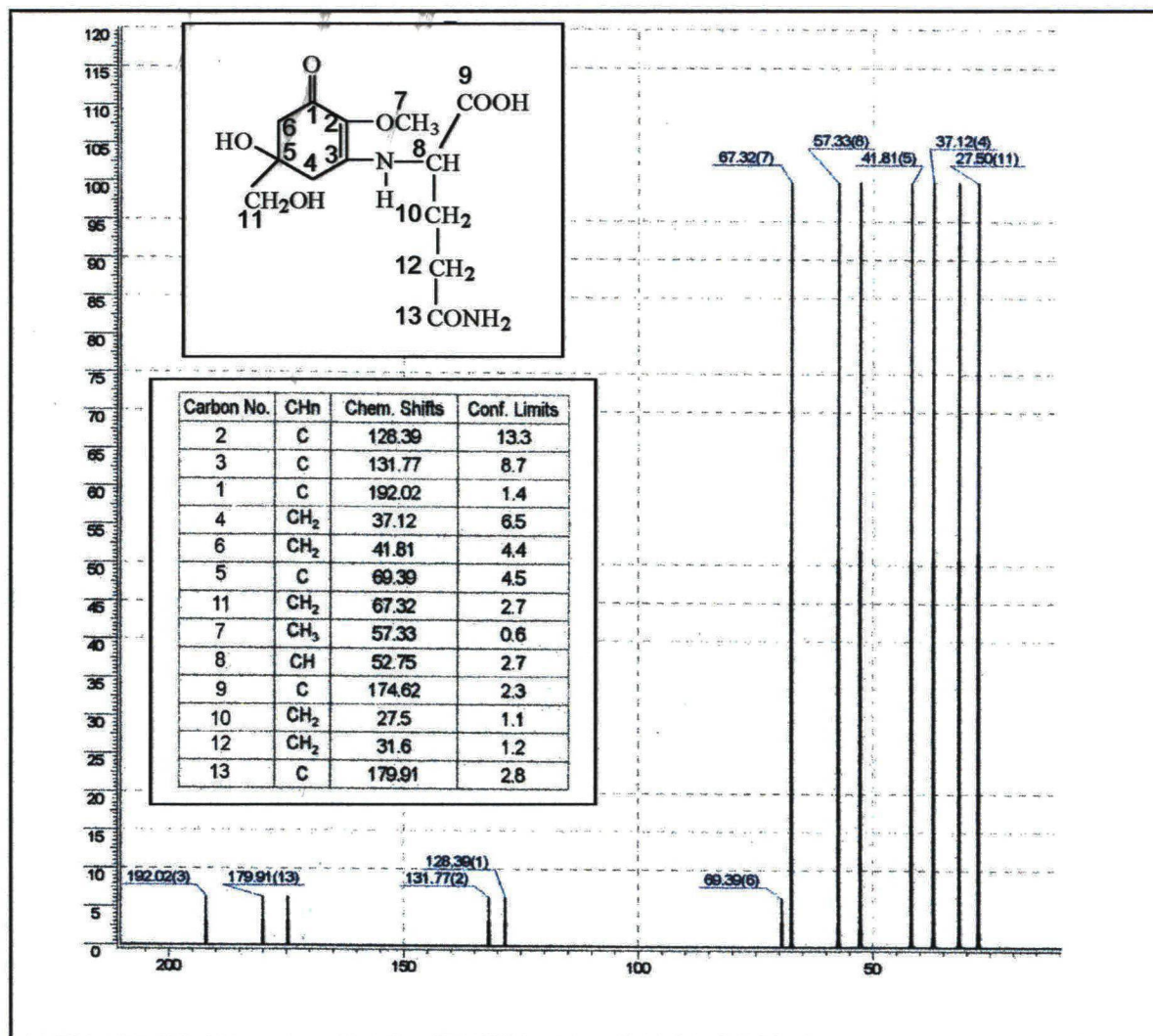


Figura 44 - Espectro simulado de ^{13}C -RMN da micosporina-glutamina. O espectro foi obtido através de consulta, via Internet (ACDLabs, <http://www.acdlabs.com>). Programa: CNMR Predictor. Os deslocamentos estão expressos em δ ppm.

Micosporina	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	Condições
A. Micosporina-ácido glutâmico (1)	179,9	134	160,3	35,6	74,6	45,6	61,9	60,2	180,5	30,9	70,1	33,9	188,4	D ₂ O
B. Micosporina-glutaminol (2)	186,4	131,1	158,9	32,5	73,1	43,9	60,2	55,9	63,5	27,6	68,6	34,6	179	Piridina
C. Micosporina-ácido glutâmico reduzido (2)	186,4	131,1	159,9	31,5	73,1	43,9	60,3	55,8	63,5	27,1	68,6	34,6	178	Piridina
D. Micosporina-ácido piroglutâmico reduzido (2)	181	134	171	38,5	75,9	43,1	64	60,8	67,5	29,3	71,5	34,1	179	Piridina
E. Micosporina-ácido piroglutâmico reduzido (3)	181 ou 179	134	171	38,5	75,9	43,1	64	60,8	67,5	29,3	71,5	34,1	179 ou 181	D ₂ O
F. Amostra, ¹³ C-RMN (□); HMQC (*); HMBC (**)	186,96**	131,22**		33,8*	74,29(□)	43,51*	59,71*	55,15*	175,18	27,37*	68,82*	31,79*	179,31**	D ₂ O

Tabela 3 - Deslocamentos químicos de ¹³C-RMN de micosporinas relatados na literatura e encontrados nas análises da fração micosporina.

Linhas A - E = Dados de literatura. Linha F = Análises da amostra através de ¹³C-RMN (□), HMQC (*) e HMBC (**). As estruturas químicas dos compostos referidos na tabela estão detalhadas na figura 39, pg. 92. Referências: (1) Young & Patterson, (1982); (2) Pittet et al., (1983a); (3) Arpin et al., (1977).

Os próximos resultados detalham os experimentos bidimensionais, que deram suporte para as análises efetuadas nos parágrafos anteriores. As correlações homonucleares COSY (Correlation Spectroscopy) (Fig. 50) e TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) (Fig. 51) e a espectroscopia de correlações heteronucleares HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) (Figs. 46-47) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) (Figs. 48-49) foram efetuadas. Os experimentos de COSY e TOCSY baseiam-se no acoplamento (escalar) homonuclear dos prótons existentes na molécula, e assim, contribuem no esclarecimento da posição dos hidrogênios. O processo ajuda a descobrir, indiretamente, o esqueleto hidrocarbônico (Silverstein et al., 1994). A correlação HMQC fundamenta-se no acoplamento escalar existente entre carbono e hidrogênio diretamente ligados, enquanto HMBC correlaciona carbonos e prótons vizinhos. A análise conjunta desses experimentos é uma estratégia preciosa na definição dos assinalamentos, uma vez que os mesmos resultam da coerência e da lógica entre diversos sinais indicados pelas análises bidimensionais. Especialmente em uma fração como a isolada no presente trabalho, que apresenta contaminantes, a combinação destas análises permite sugerir a avaliar, embora muito preliminarmente, a estrutura do composto de maior concentração na fração. Pode-se fazer uma analogia com um intrincado quebra-cabeças com peças sobrando, onde para a obtenção da estrutura final, as peças corretas devem encaixar-se perfeitamente. Silverstein et al. (1994) pondera que as correlações são argumentos mais fortes para o assinalamento do que apenas os deslocamentos químicos.

Optou-se por partir do geral para o específico. Assim, na tabela 4 (pg. 108) e figura 45 estão sumariados os assinalamentos sugeridos pela análise conjunta destes experimentos. Nos itens seguintes a esta figura e tabela encontram-se descritos cada um dos espectros bidimensionais de RMN. Como verifica-se na tabela 4, foi possível sugerir os assinalamentos de carbonos e seus respectivos hidrogênios (quando ligados aos mesmos) com deslocamentos

próximos aos determinados em micosporinas (Tabela 3, pg. 105), de maneira articulada com todas as correlações. Nas presentes análises foi observado o acoplamento no espectro de HMBC entre δ 175,18 e δ 3,77 (Fig. 49). Atribuindo-se este assinalamento ao carbono 9 (Tabela 4, pg. 108; Fig. 45) tem-se duas possibilidades para o radical, de acordo com a literatura: ácido glutâmico ou glutamina. A diferença entre ambos reside somente na presença de -OH da carboxila do C-13 na micosporina-ácido glutâmico, a qual é substituída por -NH₂ na glutamina (Fig. 39, pg. 92). Os deslocamentos químicos para os carbonos de ambas as estruturas são muito semelhantes, sendo idêntico em algumas posições, quando analisados espectros simulados (CNMR Predictor, Fig. 44). As bandas de absorção dos grupos funcionais localizam-se nas mesmas faixas no espectro de FTIR. Tendo como base estes resultados torna-se difícil distinguir as duas estruturas. No presente trabalho, os espectros de ESI-MS (Figs. 40-41), nos modos negativo e positivo apresentam picos de íon molecular correspondentes à micosporina-glutamina. Assim, torna-se possível sugerir, como principal composto da fração isolada, a micosporina-glutamina.

Uma diferença entre estas duas micosporinas, baseada somente em cálculos teóricos, refere-se ao assinalamento de H-8. Considerando os experimentos monodimensionais e bidimensionais, a esta posição atribuiu-se δ 3,77 (Tabela 4, Fig. 45), o que está em concordância com a atribuição à esta posição nos espectros simulados de ¹H-RMN (ACDLabs - HNMR Predictor). O espectro simulado da micosporina-glutamina atribuí ao H-8 δ 3,5, enquanto a todas as demais micosporinas deslocamentos na faixa de δ 4,2- δ 4,6. Na figura 45, estão descritas de forma combinada as correlações bidimensionais de RMN que sugerem micosporina com radical glutamina.

	^1H (δ)	^{13}C (δ)	Correlações
1		186,96	HMBC mostra acoplamento entre δ 186,96 e δ 2,37 (H-6). Sem próton ligado não apresenta acoplamento no COSY e TOCSY.
2		131,22	HMBC mostra acoplamento entre δ 131,22 com δ 3,62 (H-7); no HMQC o δ 3,62 acopla com δ 59,71 (C-7). Sem próton ligado não apresenta acoplamento no COSY e TOCSY.
4	2,38	33,8	HMQC mostra acoplamento entre δ 33,8 e δ 2,38.
5		74,29	Observado no ^{13}C -RMN, valor compatível com a literatura. Sem próton ligado, não apresenta acoplamento no HMQC e COSY.
6	2,37 2,67	43,51	HMQC mostra acoplamento entre δ 43,51 com δ 2,37 e δ 2,67.
7	3,61	59,71	HMQC mostra acoplamento entre δ 59,71 com δ 3,61. Não apresenta acoplamento no COSY por não ter carbono vizinho ligado a próton. Idem no TOCSY, uma vez que C-2 não apresenta próton ligado.
8	3,77	55,15	HMQC mostra acoplamento entre δ 3,77 e δ 55,15; no COSY δ 3,77 acopla com δ 2,1 (H-10) e no TOCSY com δ 2,1 (H-10) e com δ 2,44 (H-12).
9		175,18	HMBC indica acoplamento entre δ 175,18 e δ 3,77; no COSY δ 3,77 acopla com δ 2,1 (H-10) e no TOCSY com δ 2,1 (H-10) e com δ 2,44 (H-12).
10	2,10 2,05	27,37	HMQC mostra acoplamento entre δ 27,37 e δ 2,1; no COSY observa-se o acoplamento entre δ 2,1 com δ 3,77 (H-8) e δ 2,44 (H-12).
11	3,55	68,82	HMQC mostra acoplamento entre δ 3,55 e δ 68,82.
12	2,44	31,79	HMQC mostra acoplamento entre δ 2,44 e δ 31,79; no COSY observa-se acoplamento entre δ 2,44 e δ 2,1 (H-10) e no TOCSY entre δ 2,44 e δ 2,1 (H-10) e δ 3,77 (H-8).
13		179,31	No HMBC observa-se acoplamento com δ 2,44 (H-12)

Tabela 4 - Análise conjunta das correlações bidimensionais COSY, TOCSY, HMBC e

HMQC.

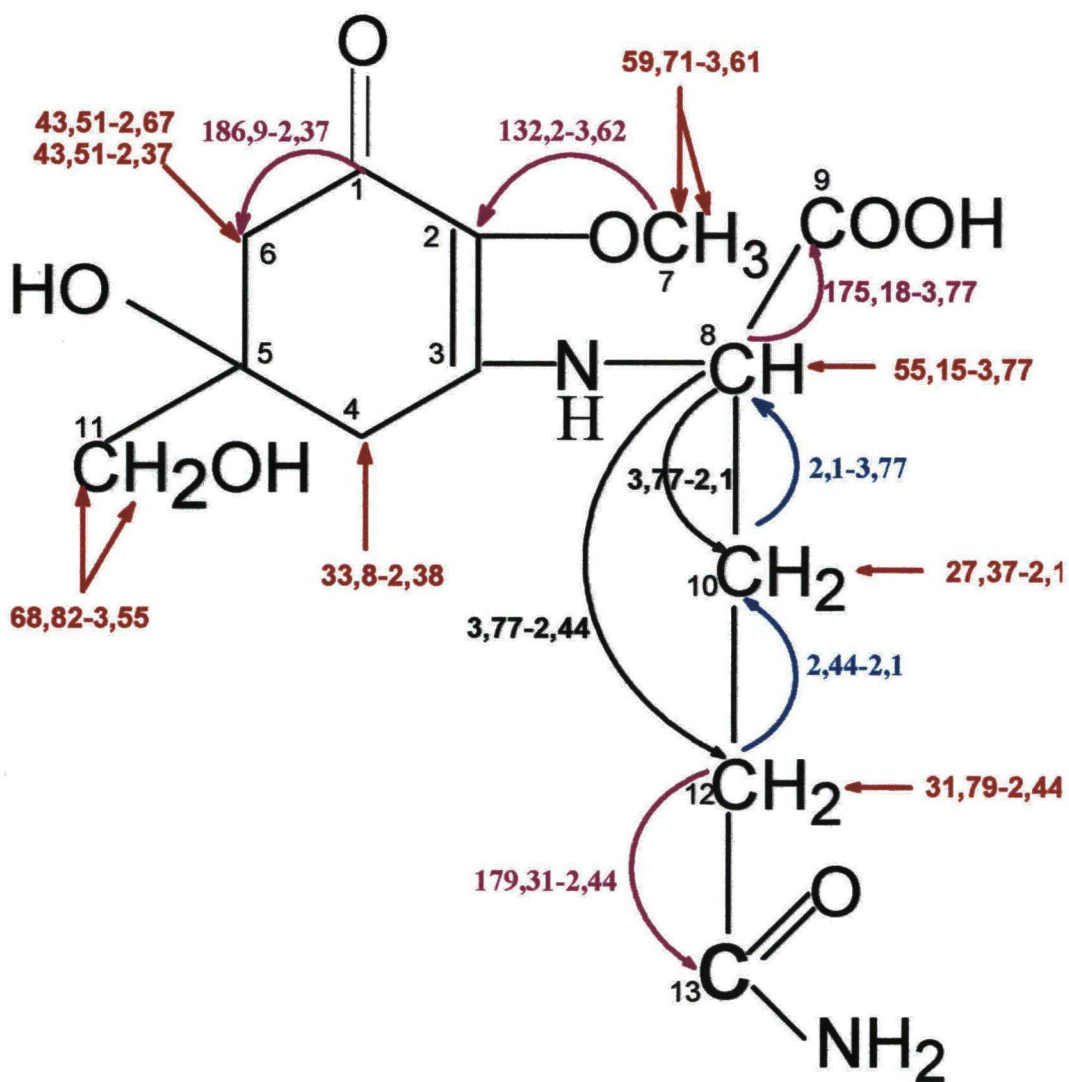


Figura 45 - Correlações homonucleares e heteronucleares sugerindo a estrutura micosporina-glutamina.

Observam-se os assinalamentos verificados nos experimentos bidimensionais. HMQC = Vermelho; HMBC = Magenta; COSY = Azul; TOCSY = Preto.

A seguir serão detalhados os espectros bidimensionais individualmente. Os resultados da espectroscopia de HMQC são mostrados nas figuras 46 e 47 e já foram detalhados na análise conjunta com os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

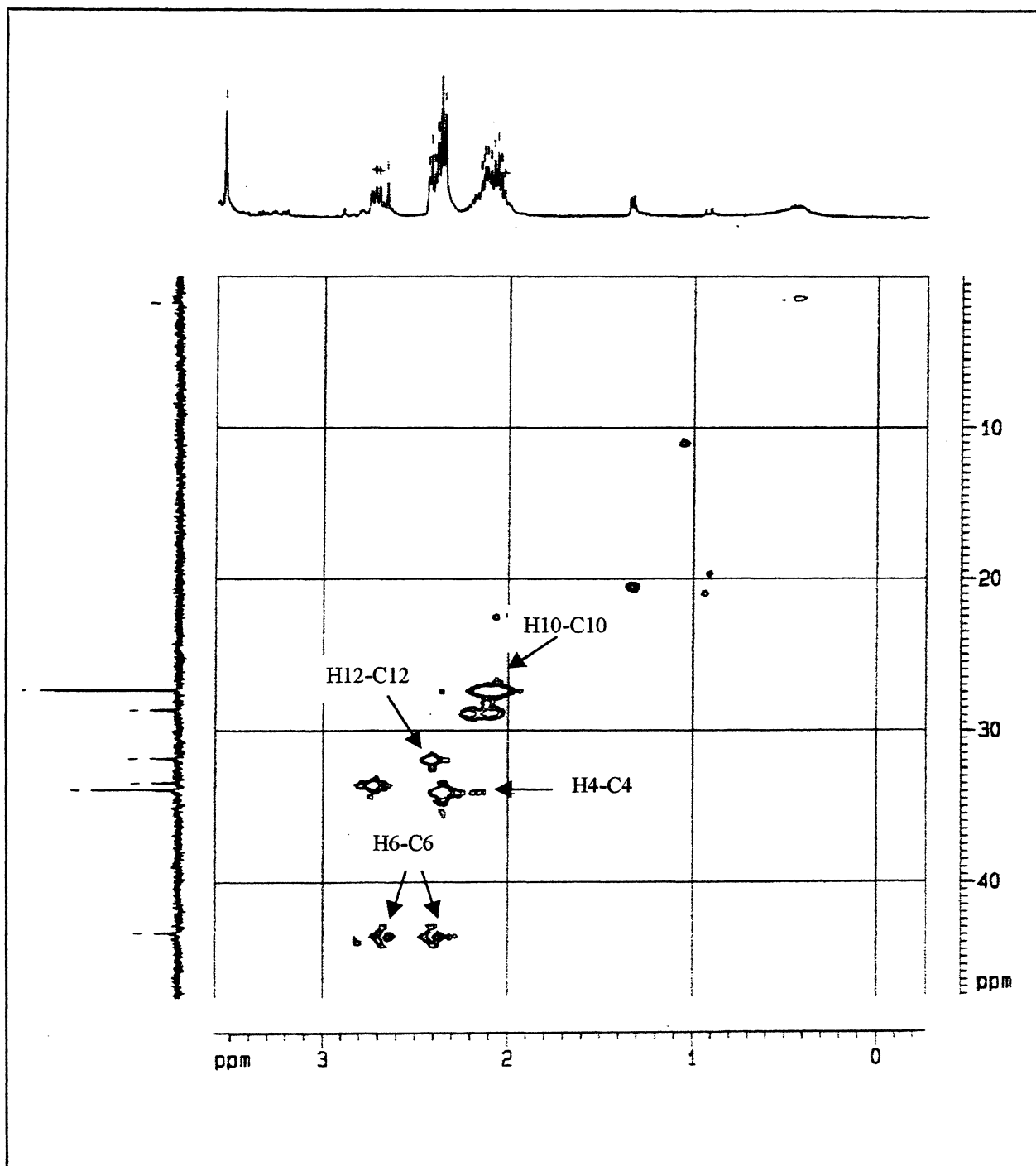


Figura 46 - Espectro parcial da correlação HMQC mostrando os acoplamentos entre C-4 e H-4, C-6 e H-6, C-10 e H-10 e C-12 e H-12.

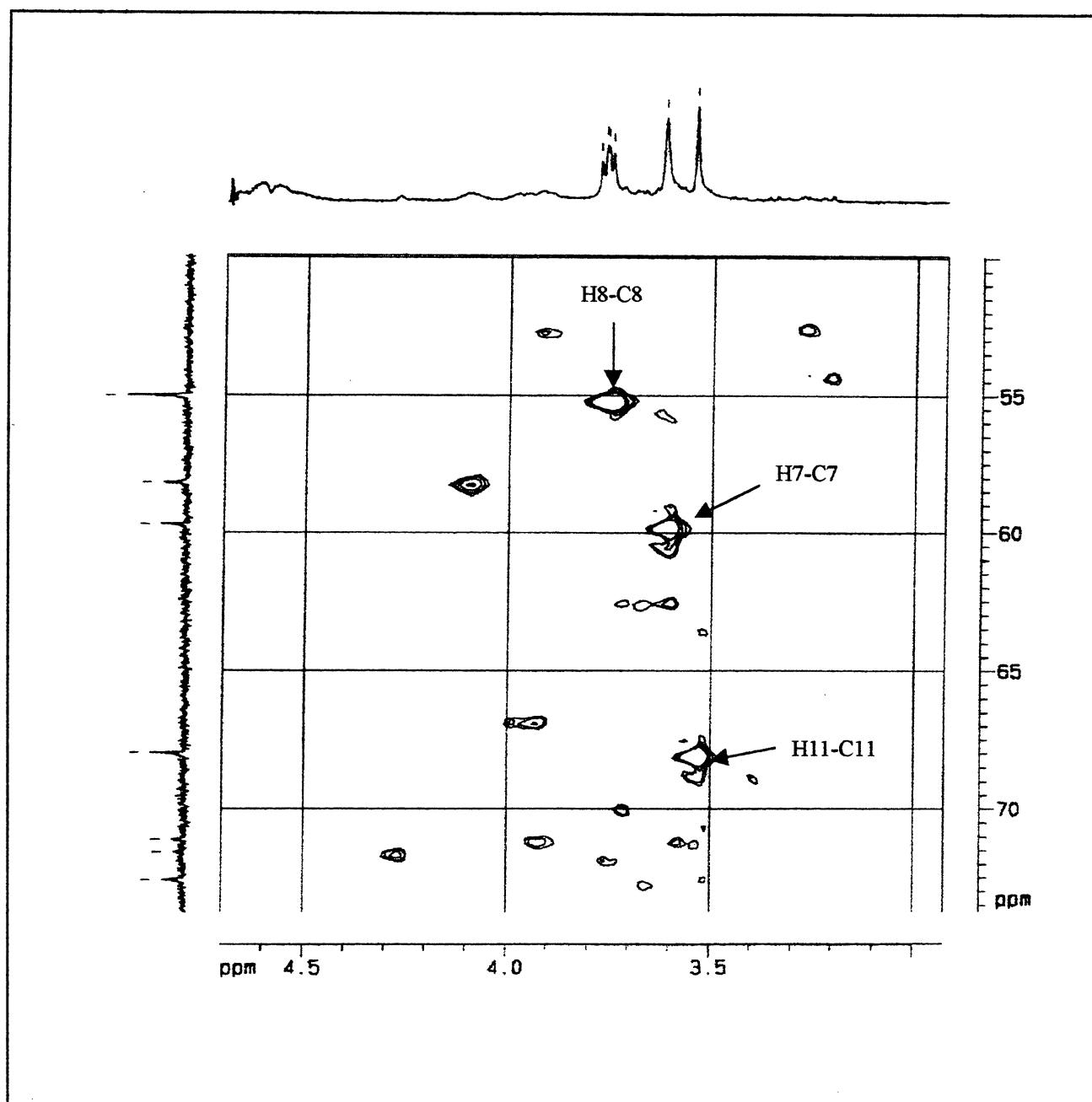


Figura 47 - Espectro parcial da correlação HMQC mostrando os acoplamentos entre C-7 e H-7, C-8 e H-8 e C-11 e H-11.

As análises de espectroscopia de HMBC, figuras 48 e 49, que correlacionam hidrogênios e carbonos vizinhos, determinaram acoplamentos de carbonos de deslocamentos químicos não observadas nas análises anteriores, correspondentes aos carbonos de carbonila ou com dupla ligação. Observa-se um sinal em δ 131,22 (C-2) acoplado com δ 3,62 (H-7) (Fig. 48). Na figura 49 verificam-se sinal em δ 186,96 (C-1) acoplado com δ 2,67 (H-6); o sinal δ 179,31 (C-13) acoplado com 2,4 (H-12) e 175,18 (C-9) com 3,77 (H-8). A presença de grupo cetona em cadeia substituída (C-1), dupla ligação entre carbonos (C-2 e C-3), grupamento éter (C-7), carboxilato/carboxila (C-9), álcool terciário (C-5) e amida (C-13) são compatíveis com as bandas de absorção verificadas no espectro de FTIR (Fig. 52).

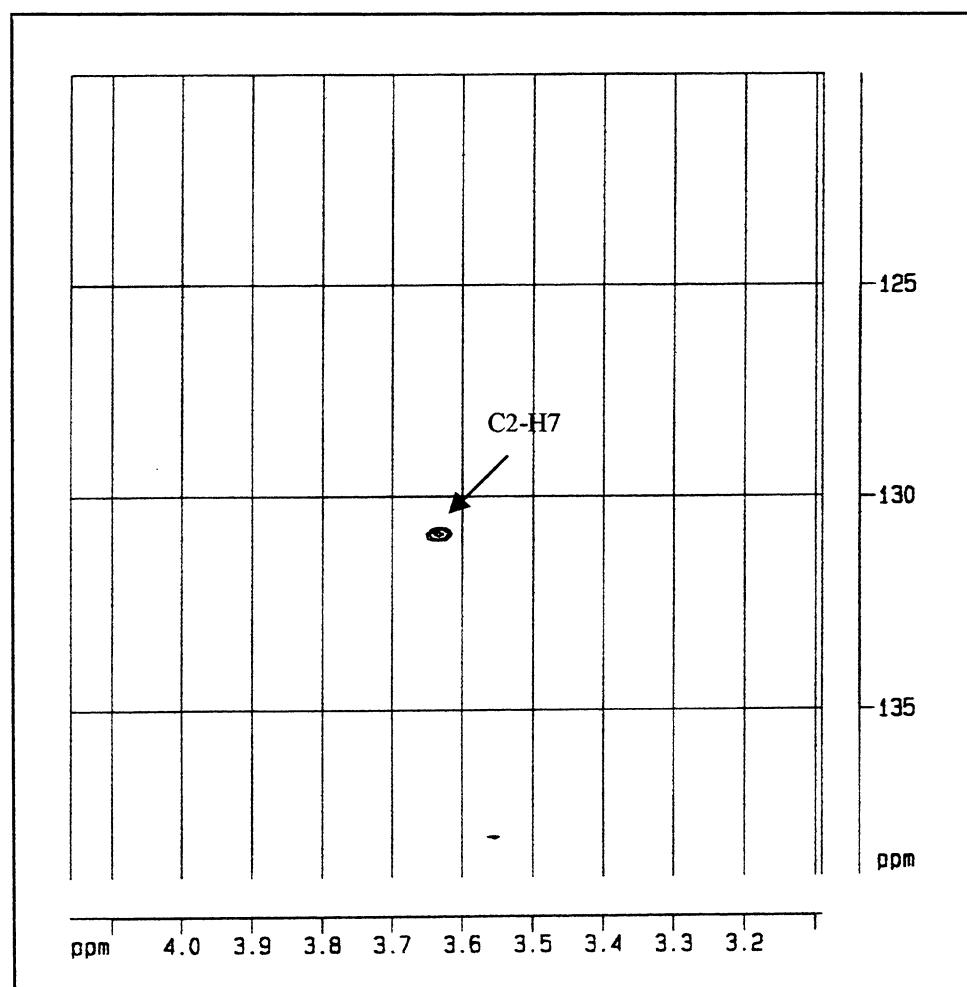


Figura 48 - Espectro parcial da correlação HMBC mostrando o acoplamento entre C-2 e H-

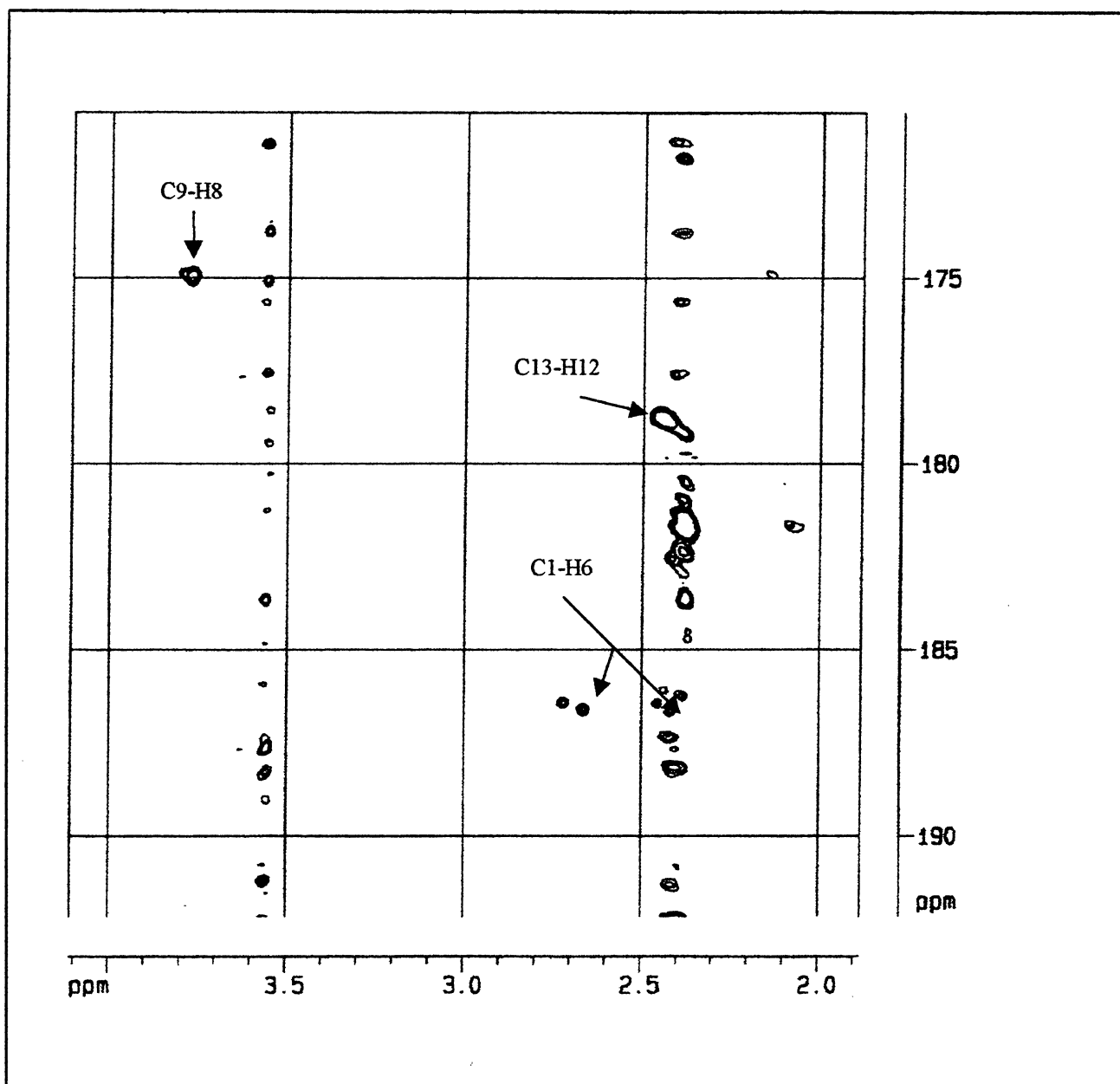


Figura 49 - Espectro parcial da correlação HMBC mostrando os acoplamentos entre C-1 e H-6, C-9 e H-8 e C-13 e H-12.

As análises de COSY TOCSY estão mostradas nas figuras 50 e 51. No COSY observa-se o acoplamento entre δ 3,77 (H-8) e δ 2,1 (H-10) e entre o δ 2,1 (H-10) e δ 2,4 (H-12). Estes acoplamentos são confirmados no TOCSY, onde verifica-se acoplamento de δ 3,77 (H-8) com δ 2,1 (H-10) e na seqüência com δ 2,4 (H-12), além δ 2,1 (H-10) com o δ 2,44 (H-12).

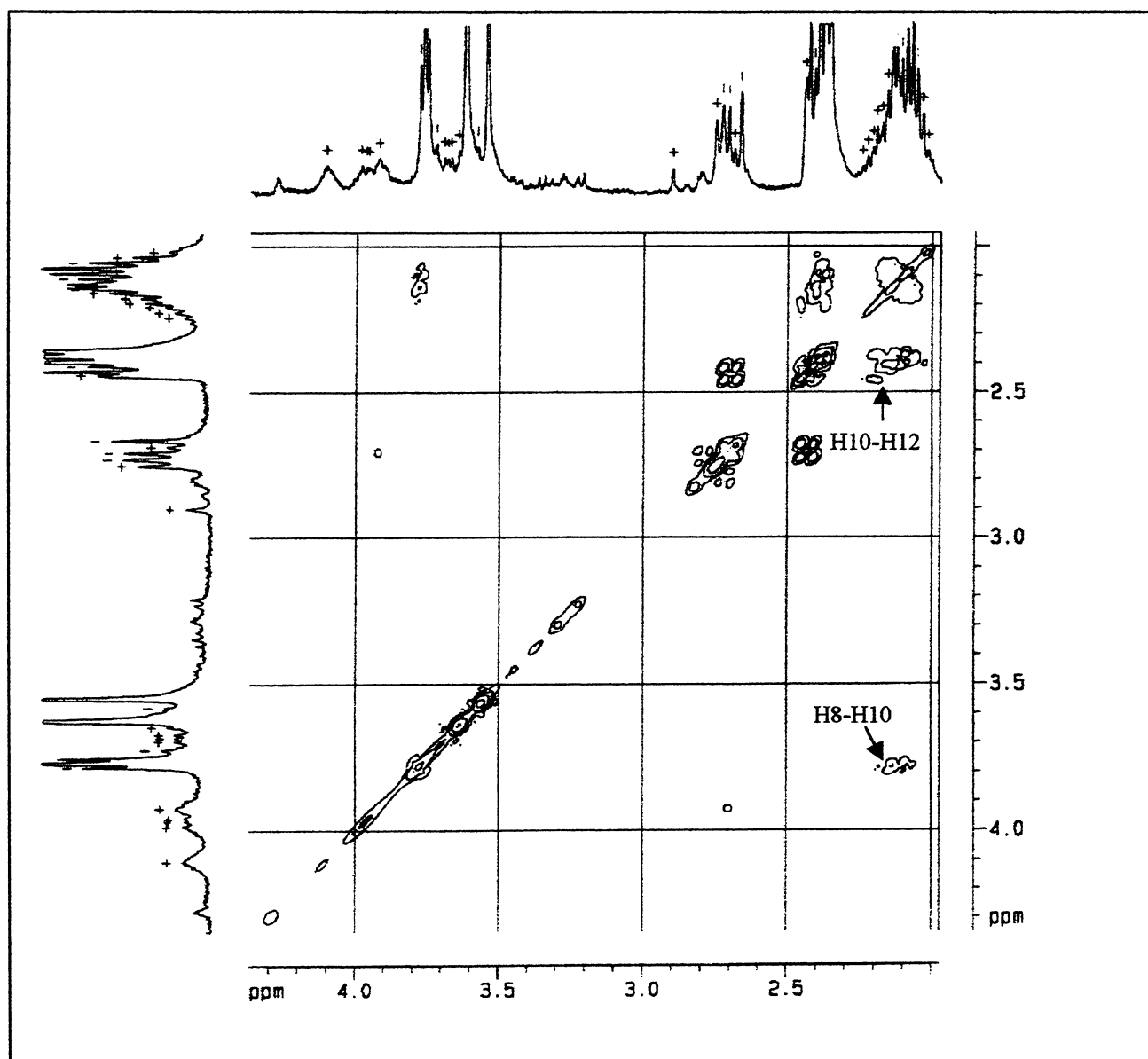


Figura 50 - Espectro de COSY.

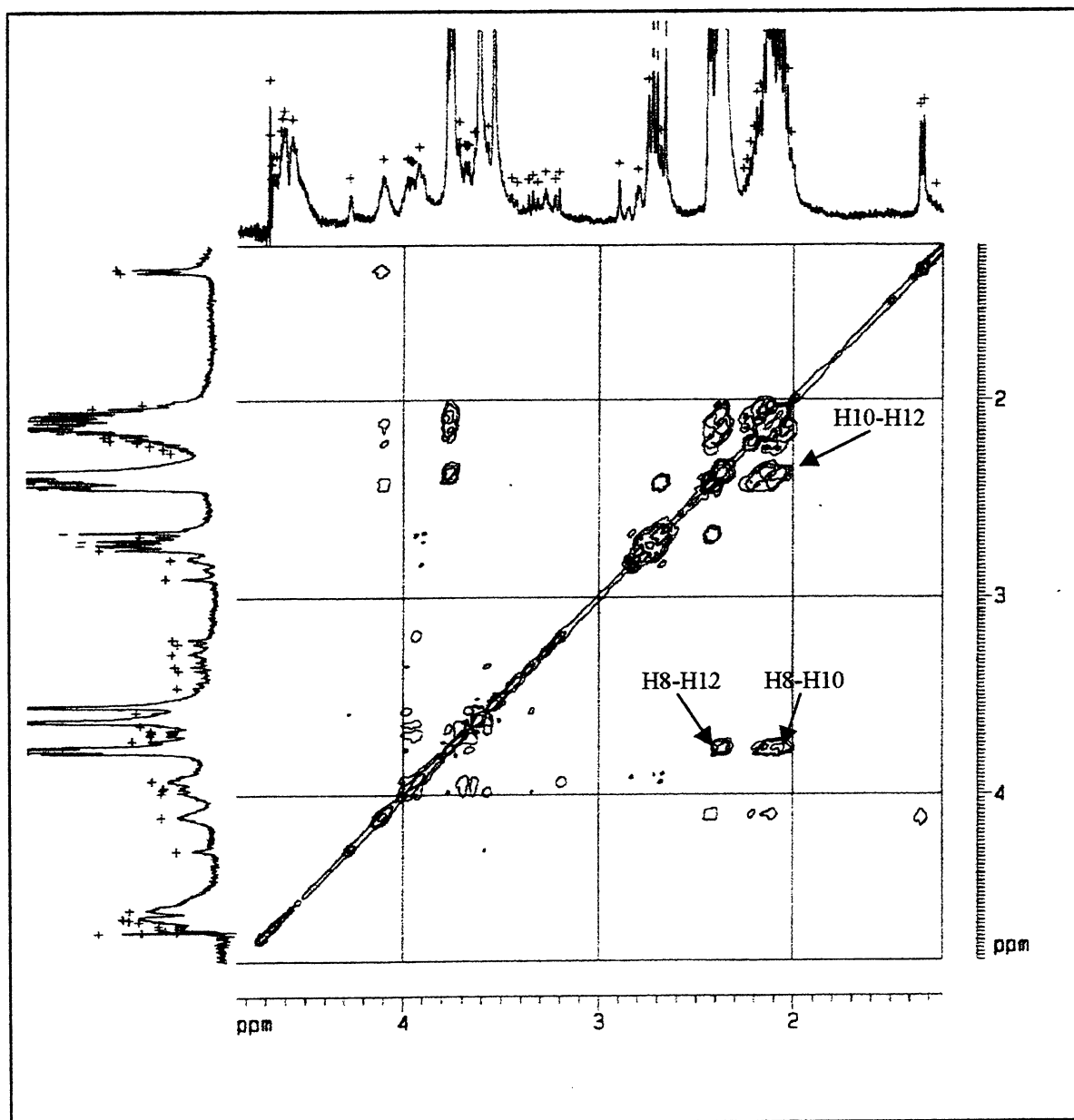


Figura 51 - Espectro de TOCSY.

5.12.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos mostraram bandas de absorção compatíveis com os grupamentos funcionais de micosporinas. Estes grupamentos apresentam bandas muito próximas, ficando sobrepostas no espectro, conforme detalhado na legenda da figura 52. Os espectros de FTIR foram analisados com o auxílio do programa Mentor Pro-2.0 (BIO-RAD) e literatura técnica clássica (Cooper, 1980; Silverstein *et al.*, 1994). Na análise efetuada pelo programa, a absorção é estabelecida tendo como base uma estrutura química que apresenta o grupamento funcional e os átomos vizinhos aos quais está ligado, como observado na figura 53. Considerando que a estrutura química exata dos grupamentos e átomos vizinhos existentes em micosporinas não estão disponíveis no programa, utilizaram-se as estruturas mais aproximadas possíveis na execução da análise. A seguir serão analisadas as principais bandas do espectro.

1) Banda larga e forte na região de $1.700-1.500\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 52, região 1). Em relação a esta banda as análises sugerem a presença de:

- carbonila da cetona (C-1, do anel ciclohexanona) absorvendo na região de $1.569,9\text{ cm}^{-1}$, conforme figura 53 (programa Mentor Pro-2). Esta absorção deve-se à vibração de estiramento da ligação C=O, compreendida entre $1.640-1.540\text{ cm}^{-1}$;

- carbonila do grupamento amida (C-13) absorvendo na região de 1.680 cm^{-1} e resultado da vibração de estiramento de C=O. Além disso, as amidas primárias podem apresentar uma ou mais bandas na região de $1.650-1.515\text{ cm}^{-1}$, devido à deformação angular de NH_2 (Silverstein *et al.*, 1994). As amidas primárias absorvem também na região de 1.400 cm^{-1} (Fig. 52, região 2) devido à deformação axial de C-N.

- carbonila de carboxila (C-9). Quando não ionizada absorve na faixa de $1.720-1.706\text{ cm}^{-1}$, como vibração de deformação axial de C=O. Pela formação de pontes de hidrogênios

internas pode sofrer redução da frequência, como observado no ácido salicílico, que absorve na faixa de 1.665 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 1994). Na forma de carboxilato, forma mais provável da micosporina da presente fração, absorve fortemente na faixa de $1.600\text{-}1.590\text{ cm}^{-1}$ e mais fracamente em 1.400 cm^{-1} , como vibração de deformação assimétrica e simétrica, respectivamente, do -C(-O)_2 ;

- dupla ligação entre carbonos (C-2 e C-3 do anel ciclohexanona), com absorção na região de 1.680 cm^{-1} , como vibração de estiramento, e na região de 800 cm^{-1} (Fig. 52, região 5) como vibração de deformação (estrutura usada como modelo pelo programa: $\text{R}_2\text{C} = \text{CRH}$). Em alquenos tetra-substituídos a absorção ocorre na faixa de $1.675\text{-}1.665\text{ cm}^{-1}$ e, em sistemas cíclicos, como ciclohexeno, observa-se a absorção em 1.646 cm^{-1} ;

- amina, que absorve na região de $1.650\text{-}1.580\text{ cm}^{-1}$, como vibração de deformação angular de N-H. Aminas absorvem na região de $1.191\text{-}1.171\text{ cm}^{-1}$ como vibração de estiramento de N-H. O programa indica, para a amina secundária de referência, absorção fraca na região de 1.569 cm^{-1} e 1.190 cm^{-1} e absorção forte na região de $750\text{-}700\text{ cm}^{-1}$. Esta última absorção deve-se à deformação angular simétrica de N-H.

2) Absorção na região de 1.200 cm^{-1} (Fig. 52, região 3) e 840 cm^{-1} (Fig. 52, região 5) sugerindo grupamento éter (C-7, metóxi ligado ao anel ciclohexanona). A absorção na região de 1.200 cm^{-1} é resultado de vibração de estiramento assimétrico e a absorção região de 840 cm^{-1} é produto do estiramento simétrico. A absorção deste grupamento em 1.190 cm^{-1} é classicamente estabelecida (Cooper, 1980).

3) Absorção nas regiões de 1.400 cm^{-1} e 1.325 cm^{-1} (Fig. 52, região 2); 1.200 cm^{-1} e 1.180 cm^{-1} (Fig. 52, região 3); 1.120 cm^{-1} (Fig. 52, região 4) sugerem a presença de álcool terciário (C-5, anel ciclohexanona). As vibrações de deformação do C-O de álcoois terciários produzem absorção na região de $1.205\text{-}1.124\text{ cm}^{-1}$ do espectro. As vibrações de deformação de O-H absorvem na região de $1.420\text{-}1.330\text{ cm}^{-1}$. Apesar de extensiva liofilização, a amostra

apresentou água associada e conseqüentemente a banda de O-H de álcoois primários tornou-se difícil de analisar, mesmo na pastilha de KBR.

Os principais grupamentos funcionais para a micosporina-glutamina foram sugeridos no espectro. A presença de grupamento carbonila já foi verificada através de espectrometria de infravermelho em micosporina-serinol (Favre-Bonvin *et al.*, 1976). Os autores relatam a presença do grupamento absorvendo em 1.640 cm^{-1} , outra banda igualmente importante em 1.540 cm^{-1} . As outras bandas listadas neste trabalho são: 1.450, 1.400, 1.265, 1.185, 1.120, 1.075, 1.040 e 980 cm^{-1} . Como pode-se observar, as bandas 1.400, 1.185 e 1.120 cm^{-1} são exatamente coincidentes com as principais bandas observadas através de FTIR no presente trabalho.

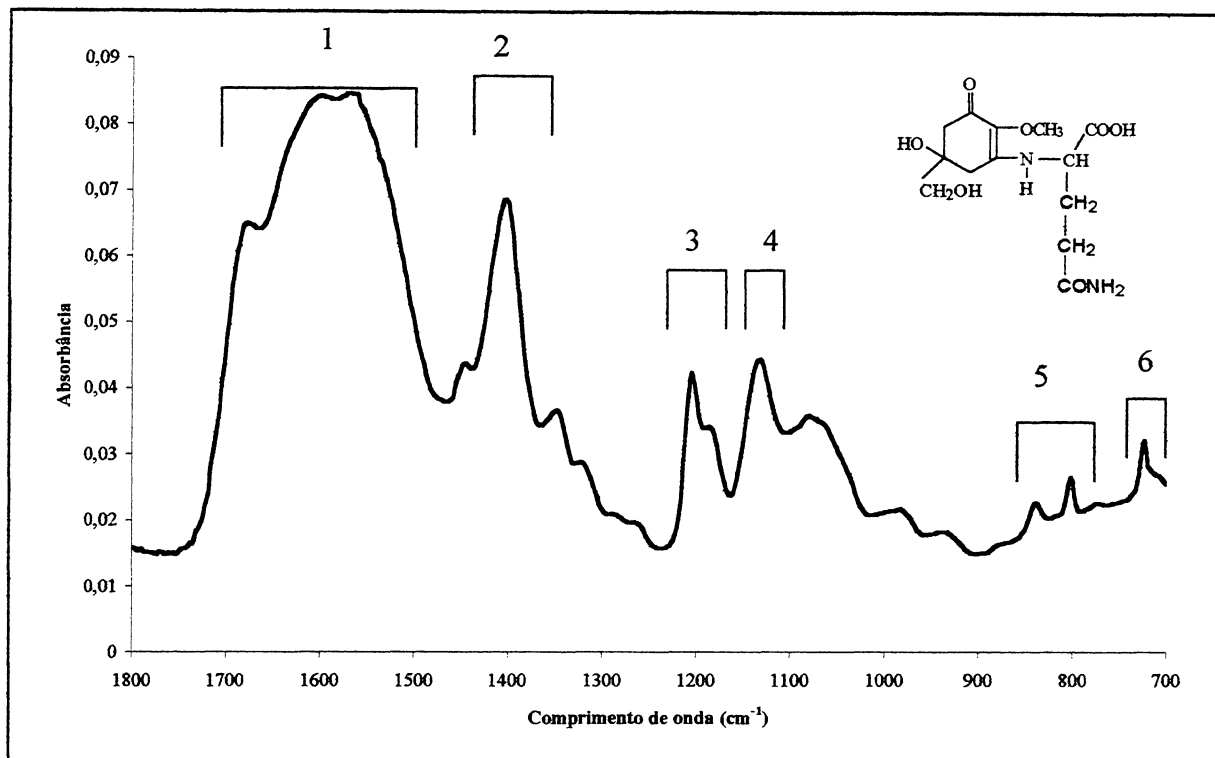


Figura 52 - Espectro de FTIR da fração micospolina

As principais bandas, relacionadas abaixo, indicam os grupamentos funcionais presentes na micospolina-glutamina. Detalhes encontram-se descritos no texto.

1. 1.700-1.500 cm^{-1} - Cetona, amida, amina, carboxila e C=C.
2. 1.400 cm^{-1} , 1.350 cm^{-1} - Amida, álcool terciário, carboxila.
3. 1.200 cm^{-1} , 1.190 cm^{-1} , 1.180 cm^{-1} - Éter, álcool terciário, amina.
4. 1.120 cm^{-1} - Álcool terciário.
5. 840 cm^{-1} , 800 cm^{-1} - C=C, éter .
6. 720 cm^{-1} - Amina.

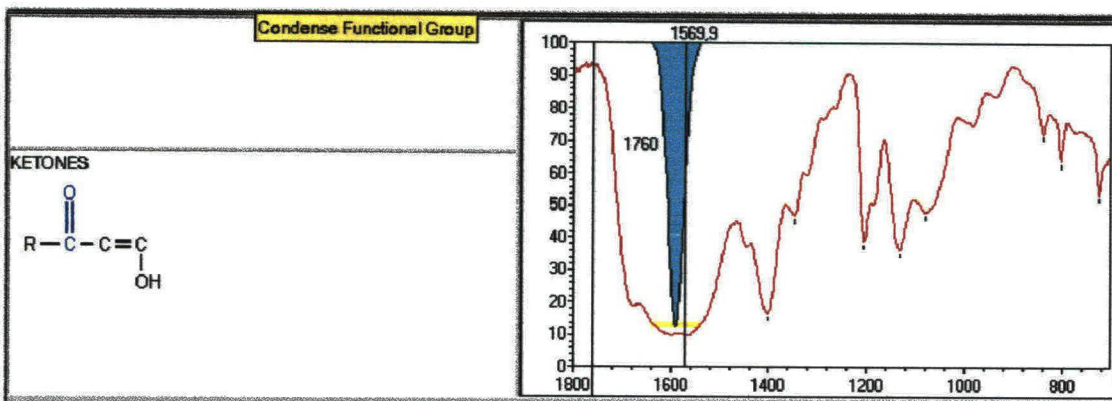


Figura 53 – Identificação, pelo programa Mentor Pro - 2.0, do grupamento carbonila de cetona no espectro de FTIR.

O cone azul identifica no espectro a região de absorção do grupamento carbonila da cetona cuja estrutura está descrita à esquerda.

5.13 ENSAIOS BIOLÓGICOS DA FRAÇÃO MICOSPORINA

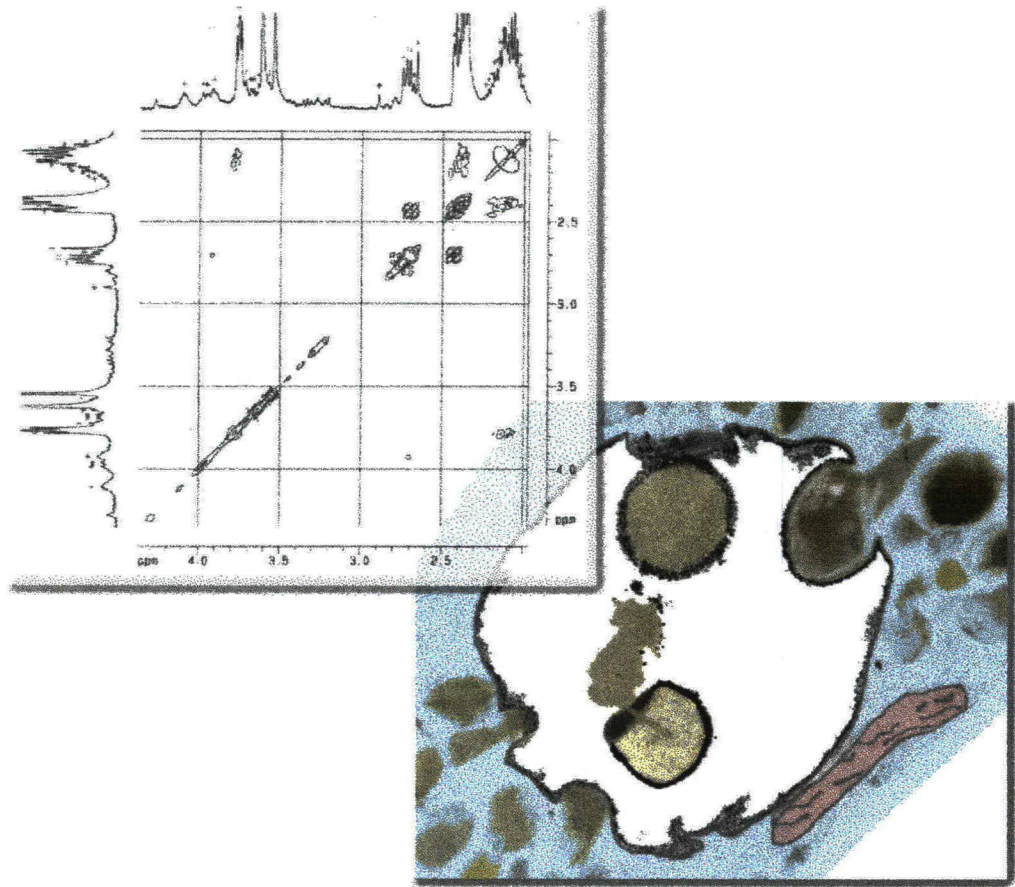
Nos ensaios sobre a germinação houve algumas dificuldades operacionais. Leite & Nicholson, (1992) utilizaram o sistema de gotas sobre lâminas recobertas com poliestireno, uma superfície apolar. Procurou-se manter o mesmo sistema. Entretanto, nas condições do presente trabalho não se conseguiu germinação homogênea em lâminas de vidro recobertas com poliestireno. A confecção destas lâminas é feita pela dissolução de placas de cultura de poliestireno em acetato de amila, seguida de extensiva evaporação do solvente em capela. As placas e o acetato de amila não eram da mesma origem dos utilizados por Leite & Nicholson (1992); portanto, a superfície formada não foi a mesma. Testou-se a germinação diretamente em placa de poliestireno, sem dissolução em acetato de amila. Porém, a nível microscópico, a superfície é muito irregular, com elevações e reentrâncias, observando-se o acúmulo de conídios germinados nas depressões e menor número nas elevações. Conseqüentemente, também não é indicada para os ensaios biológicos. Outras superfícies foram testadas, como lâminas e lamínulas de vidro, parafilme, membrana de diálise, membrana de celofane. Embora os fungos germinem nas mesmas condições descritas nos ensaios citoquímicos e de M. E. T. (Figs. 14, 18), nos quais utilizam-se grandes volumes de suspensão de conídios, no sistema de gotas não houve boa germinação. Por exemplo, a membrana de celofane utilizada nos ensaios com fluoreto (Fig. 31), nas condições padronizadas, apresenta alta taxa de germinação, ao passo que no sistema de gotas, a germinação é muito baixa e irregular, sendo que a gota espalha-se também irregularmente sobre a superfície. Na superfície de acetato de celulose foi observada elevada porcentagem de formação de apressórios sem a formação de longos tubos germinativos, em uma distribuição regular ao longo da gota, e reprodutível. As

observações ao microscópio de luz não mostraram alterações do aspecto da membrana, mesmo após 72 h de germinação. Assim, utilizou-se esta superfície para os ensaios biológicos. Nestas condições a fração micosporina isolada não apresentou efeito sobre a germinação, conforme observado na tabela 5. Os resultados da tabela referem-se à soluções com $Abs_{310nm} = 0,9$ (diluição para leitura = 1:2). Soluções mais concentradas também não apresentaram efeito sobre a germinação.

Condição	Porcentagem de germinação
Tratado	$97,7 \pm 2,3$
Controle	$96,7 \pm 3,4$

Tabela 5 - Efeito da fração micosporina isolada sobre a germinação.

Os conídios foram incubados de acordo com a metodologia. Os resultados representam média de 4 experimentos efetuados em triplicata.



Discussão

Conclusões

6 DISCUSSÃO

6.1 ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA EM *C. graminicola*

A presença da atividade da fosfatase ácida no homogenato de *C. graminicola* (Figs. 1-5) é confirmada pelos estudos que demonstram citoquimicamente sua presença em diferentes fases da germinação deste fungo (Figs. 21-30). Esta enzima já havia sido anteriormente verificada em isolados de *C. graminicola* e *C. truncatum*, através de zimogramas, em estudos taxonômicos (Huguenin *et al.*, 1982). Em outros fungos, a fosfatase ácida tem sido estudada, purificada e suas características cinéticas e estruturais determinadas (Trimble *et al.*, 1981; Nahas *et al.*, 1982; Ram *et al.*, 1983; Barbarié *et al.*, 1984; Schönholzer *et al.*, 1985; Sato & Ohta, 1985; Kroehler *et al.*, 1988; Moran *et al.*, 1989; Galabova *et al.*, 1993; Gonzalez *et al.*, 1993; Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993; Famurewa & Olutiola, 1994; Ezawa *et al.*, 1995; Versaw & Metzzenberg, 1995; Nozawa *et al.*, 1998).

A atividade da fosfatase ácida em conídios de *C. graminicola* apresenta pH ótimo ácido (Fig. 6), como observado para fosfatase ácida de outros fungos. Como exemplo, pode-se citar fosfatase ácida de *Saccharomyces carlsbergensis* (Tonino & Steyn-Parvé, 1963), *C. lipolytica* (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993) e *A. flavus* (Famurewa & Olutiola, 1994). A sua localização é predominantemente intravacuolar, demonstrada através de método citoquímico (Fig. 21). Então, torna-se lógica atividade máxima em pH ácido, uma vez que vacúolos de fungos são organelas ácidas e podem ser considerados análogos a lisosomas de células animais (Klionsky *et al.*, 1990).

A atividade da fosfatase ácida demonstrou ser termoestável, semelhante ao observado em fosfatases de outras origens, como fosfatase ácida purificada de sementes germinadas em

V. sinensis (Biswas & Cundiff, 1991), *A. flavus* (Famurewa & Olutiola, 1994), *C. lipolytica* (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993) e fígado de rato (Dittmann & Harisch, 1995). O efeito de diferentes concentrações de substrato indicam K_M aparente de 0,631 mM, valor próximo do observado de K_M para o pNPP em fosfatase ácida purificada de plantas (Rossi *et al.*, 1981; Bhargava & Sachar, 1987), embora valores de K_M situados dentro de uma faixa mais ampla sejam verificados em diferentes fungos (Arnold & Garrinson, 1979; Pasqualini *et al.*, 1992; Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993). A dependência do tempo é similar à observada em fosfatase ácida purificada de fígado de rato (Dittmann & Harisch, 1995).

Neste trabalho, utilizou-se o rompimento celular para a obtenção do homogenato na maioria dos ensaios espectrofotométricos. O rompimento das células é o método mais utilizado na obtenção das frações apresentando atividade da fosfatase ácida intracelular (Vasileva-Tonkova *et al.*, 1993; Galabova *et al.*, 1993). Além do rompimento celular, testou-se também a permeabilização celular. O método padronizado para a determinação da fosfatase ácida em *C. lipolytica*, através da permeabilização com Triton X-100 (Galabova *et al.*, 1993), adequou-se a *C. graminicola*, com algumas modificações. A permeabilização celular é uma maneira mais fácil, mais econômica e mais rápida da obtenção da atividade enzimática. Comparando com estudo efetuados em *C. lipolytica* (Galabova *et al.*, 1993), foi observado que o efeito das diferentes concentrações de Triton X-100 (Fig. 9) sobre a atividade da fosfatase ácida é semelhante ao descrito para a levedura. Em contraste, a influência da temperatura sobre a permeabilização tem outro comportamento. Em *C. graminicola*, ocorre aumento da permeabilização em temperaturas elevadas sem perda da atividade (Fig. 10), enquanto em *C. lipolytica* ocorre uma diminuição da atividade a partir de 30° C (Galabova *et al.*, 1993). A permeabilização com manutenção da atividade em elevadas temperaturas provavelmente deve-se à termoestabilidade da enzima (Fig. 7).

Na comparação das atividades intra e extracelulares optou-se também pela permeabilização celular. A predominância intracelular da atividade da fosfatase ácida (Fig. 8) em conídios não germinados de *C. graminicola*, quando comparadas às atividades no conídio intacto e permeabilizado, é confirmada pelos estudos citoquímicos demonstrando a sua localização intravacuolar (Figs. 21-23). A sua localização em vacúolos de fungos tem sido relatada, como em micélio de *Sclerotinia fructigena* (Hislop *et al.*, 1974), ascos de *Chaetomium brasiliense* (Rosing, 1984), basidiósporos dormentes de *P. cubensis* (Ruch & Motta, 1987), hifas de *S. rolfsii*. (Hänssler *et al.*, 1975), da micorriza *G. margarita* (Saito, 1995) e na levedura *S. cerevisiae* (Rijn *et al.*, 1975). Vacúolos de células vegetais também apresentam a enzima, como cotilédones de feijão (Herman *et al.*, 1981) e durante a esporogênese da angiosperma *Datura* (Sangwan *et al.*, 1989). A baixa atividade verificada no conídio intacto (Fig. 11) sugere que uma pequena fração desta atividade está presente extracelularmente, a qual não é detectada pelos estudos citoquímicos (Fig. 21). Na levedura *Saccharomyces carlsbergensis* (Tonino & Steyn-Parvé, 1963) a atividade está localizada na parede celular. Em *S. cerevisiae* esta atividade encontra-se em organelas intracelulares e parede celular (Linnemans *et al.*, 1975). Em *R. glutinis* está demonstrada a presença de uma fosfatase ácida extracelular, caracterizada como uma glicoproteína constituída de duas subunidades iguais (Trimble *et al.*, 1981). A localização predominantemente extracelular da fosfatase ácida foi demonstrada citoquimicamente no espaço periplasmático em *S. rouxii* (Arnold & Garrinson, 1979). Em *P. cubensis* a atividade enzimática localiza-se, dentre outros locais, ao longo da membrana plasmática, na parede celular e espaço periplasmático (Ruch & Motta, 1987).

O aumento da atividade da fosfatase ácida durante o envelhecimento dos conídios (Fig. 13) pode refletir alterações no sistema lítico, uma vez que ocorre grande aumento dos vacúolos durante o envelhecimento (Leite, 1992; Mims *et al.*, 1995) e que a enzima localiza-

se principalmente nestes compartimentos (Figs. 21-23). O aumento da fosfatase ácida em processos de senescência é conhecido, como em folhas de arroz (Huang & Kao, 1991). Em *S. cerevisiae*, durante o processo autolítico, a atividade da fosfatase vacuolar aumenta cinco vezes, quando comparada com os níveis basais (Sato & Ohta, 1985).

A comparação da atividade da fosfatase ácida entre homogenato de conídios não germinados e germinados demonstrou diminuição da atividade no germinado (Fig. 12). Entretanto, as análises citoquímicas mostram aumento da deposição de produto de reação para fosfatase ácida no conídios germinados. Conídios não germinados (Fig. 21) apresentam produto de reação associado à membrana de dois pequenos vacúolos, muito menores que os vacúolos do conídio germinado, que apresenta o produto de reação da fosfatase ácida não somente associado à membrana vacuolar, mas também no lúmen do compartimento (Fig. 24). Semelhante fenômeno é observado no tubo germinativo (Fig. 25). Além disso, o apressório apresenta grande número de vesículas densamente marcadas para fosfatase ácida (Figs. 26-27). Portanto, as evidências citoquímicas ultraestruturais indicam que ocorre um aumento da atividade durante a germinação.

Além dos resultados citoquímicos sugerirem o aumento da atividade da fosfatase ácida durante o processo germinativo, embora não sejam quantitativos, eles também contribuem para a compreensão da função da enzima. Para entender o papel de uma enzima no metabolismo celular é importante conhecer a sua localização, como referido por Tonino & Steyn-Parvé, (1963) no estudo da fosfatase ácida em *Saccharomyces carlsbergensis*. Fosfatase ácida presente em fungos hidrolisa ésteres de fosfato, produzindo fosfato inorgânico (Arnold & Garrinson, 1979; Trimble *et al.*, 1981; Barbarié *et al.*, 1984; Kroehler *et al.*, 1988; Moran *et al.*, 1989; González *et al.*, 1993), elemento conhecido como essencial no metabolismo fúngico (Mann, 1944). Porém, o papel que esta atividade desempenha na fisiologia celular varia dependendo da localização da enzima. Por exemplo, a fosfatase ácida

intracelular em raízes de trigo foi considerada responsável pela regulação da renovação de fosfato dentro da célula (Szabo-Nagy *et al.*, 1987). Fosfatase ácida secretada tem a função de hidrolizar ésteres de fosfato extracelulares (Nahas *et al.*, 1982) ou, quando presente na superfície celular, pode desempenhar funções específicas, como sugerido na organização da parede celular de *S. cerevisiae* (Rijn *et al.*, 1975; Linnemans *et al.*, 1977) e de *C. albicans* (Tronchin *et al.*, 1989).

Os resultados citoquímicos demonstrando a presença da fosfatase ácida no interior dos vacúolos (Figs. 21-23), discutidos adiante com mais detalhes, sugerem que esta enzima, presente em conídios de *C. graminicola*, pode desempenhar o papel universalmente atribuído à fosfatase ácida, ou seja, a hidrólise dos ésteres de fosfato (Trimble *et al.*, 1981; Barbarié *et al.*, 1984; González *et al.*, 1993), os quais poderiam ser captados pelos vacúolos. Entretanto, não se pode descartar que a enzima tenha participação na hidrólise de substratos específicos que apresentem fosfato, captados ou armazenados pelos vacúolos, uma vez que vacúolos de fungos podem armazenar fosfatos, como observado em *N. crassa* (Cramer *et al.*, 1980) e em *S. cerevisiae* (Indge, 1968; Klionsky *et al.*, 1990).

Especificamente no presente estudo, a deposição do produto de reação da fosfatase ácida, associado à face interna da membrana dos vacúolos (Fig. 23), mostrou-se um marcador de membrana extremamente útil no estudo da função vacuolar. Embora a atividade da fosfatase ácida não esteja relacionada diretamente com o metabolismo de lipídios, a marcação será utilizada, nos próximos itens, no estudo da função vacuolar relacionada a mobilização de reservas. A seguir serão discutidos aspectos morfológicos e ultraestruturais, pré-requisitos para a compreensão mais detalhada dos resultados citoquímicos ultraestruturais.

6.2 RESERVAS NUTRICIONAIS EM *C. graminicola*

A abundância de lipídios em conídios não germinados (Figs. 14, 17A) foi previamente verificada em *C. graminicola* (Mims *et al.*, 1995), *C. gloeosporioides* (Kerrigan & Mims, 1993) e *C. truncatum* (Van Dyke & Mims, 1991), através de criofixação e observações em microscopia eletrônica de transmissão. Lipídios também são armazenados em esporos de inúmeros outros fungos, como em *N. tetrasperma* e *T. caries* (Weete, 1984), *P. cubensis* (Ruch & Motta, 1987), *A. campestris* (Ruch & North, 1988), *C. molybdites*, *O. radicata* e *L. naucina* (Ruch *et al.*, 1991).

A coloração com diferentes tipos de Sudan (Sudan III, Sudan IV, Sudan Black) baseia-se na apolaridade do corante e é usada para a detecção citoquímica de lipídios em diferentes tipos celulares (Culling, 1983). Essa técnica tem sido utilizada no estudo dos lipídios em alguns fungos como em micélio de *Rhodotorula gracilis* (Thakur *et al.*, 1988) e em basidiósporos de *C. molybdites*, *O. radicata*, *L. naucina* e *Cropinus comatus* (Ruch *et al.*, 1991). No presente trabalho, os resultados demonstram que o armazenamento dos lipídios acontece na conidiogênese (Figs. 14A-14C). As imagens sugerem que a célula conidiogênica sintetiza o material lipídico, o qual pode ser transferido para o conídio em formação. A diminuição dos lipídios durante o envelhecimento (Figs. 14D-14F) está em acordo com a diminuição destas reservas observada anteriormente a nível ultraestrutural, quando comparados conídios de 5 e 35 dias (Mims *et al.*, 1995). O principal componente dos depósitos lipídicos em fungos são triacilgliceróis, (Beattie *et al.*, 1993; Gaspar *et al.*, 1994). Assim, é provável que os triacilgliceróis sejam os principais lipídios de armazenamento em *C. graminicola*. Os resultados sugerem que uma das funções das reservas lipídicas é o suprimento energético durante o envelhecimento na cultura, quando as condições nutricionais externas tornam-se deficientes. Esta situação tanto pode ocorrer no meio de cultura, como no

caso dos conídios do experimento, ou quando o conídio é disperso no ambiente e necessita manter o seu metabolismo até encontrar o hospedeiro.

A existência de lipídios em estruturas de infecção (Figs. 15B-15D, 17C) está relatada na literatura. No tubo germinativo foi demonstrada em *U. phaseoli* e em *C. truncatum* (Hoch & Staples, 1987). Da mesma forma, foi observado no apressório de vários fungos como *M. grisea* (Bourett & Howard, 1990), *G. juniperi-virginianae* (Mims & Richardson, 1989) e também em *C. graminicola* germinado sobre folhas de milho e aveia (Politis, 1976; Politis & Wheeler, 1973). Os resultados obtidos sugerem que a utilização dos lipídios acontece desde as etapas mais iniciais até as fases mais avançadas da germinação. As análises são insuficientes para determinar se existe somente transferência de lipídios do conídio para as estruturas de infecção, com reorganização ultraestrutural, ou se os lipídios sofrem algum tipo de processamento bioquímico.

A mobilização de lipídios observada durante a germinação (Fig. 15) está em acordo com estudos anteriores relatando a utilização destas reservas durante o processo germinativo em diferentes fungos (Farkas & Ledingham, 1959; Mims, 1971; Maxwell *et al.*, 1977; Weete, 1974; 1984; Salako, 1981; Ruch *et al.*, 1991; Maia *et al.*, 1994). Por exemplo, o desaparecimento dos corpos lipídicos presentes em esporos durante a germinação foi verificado em *A. cinerea* (Mims, 1971), *P. recondita* (Salako, 1981) e *G. albida* (Glomales) (Maia *et al.*, 1994). Embora estudos na germinação de espécies de *Colletotrichum* já tenham sido efetuados como em *C. lindemuthianum* (O'Connell *et al.*, 1985), *C. truncatum* (Van Dyke e Mims, 1991) e *C. graminicola* germinado sobre folhas de milho e aveia (Politis, 1976; Politis & Wheeler, 1973), a mobilização de lipídios e os eventos no conídio germinado resultante não foram abordados. Leite (1992) demonstrou que a capacidade de germinação diminui com o envelhecimento dos conídios de *C. graminicola*. Como visto, conídios velhos apresentam menores quantidades de lipídios armazenados (Fig. 14). É possível que a baixa

quantidade destas reservas seja um dos fatores que contribui para a diminuição da capacidade germinativa em conídios velhos.

Além da óbvia reserva de energia, os lipídios podem ser utilizados no ciclo do glioxilato (Maxwell *et al.*, 1977; Gaspar *et al.*, 1994; Maia *et al.*, 1994). A presença de microcorpos próximos aos depósitos de lipídios e mitocôndrias, observada no apressório (Fig. 19A), é muito sugestiva dessa possibilidade (Ruch & North, 1988; Ruch *et al.*, 1991; Mills & Cantino, 1975). Esta arquitetura é um fenômeno comum em fungos e plantas que armazenam lipídios como principal reserva (Maxwell *et al.*, 1977; Tolbert & Essner, 1981; Ruch & Motta, 1987; Ruch & North, 1988; Van Dyke & Mims, 1991).

Embora o principal composto de reserva sejam os lipídios, os conídios também apresentam grânulos provavelmente de glicogênio (Fig. 17B). Esta hipótese é amparada no fato de apresentarem morfologia e distribuição correspondentes ao glicogênio demonstrado citoquimicamente em conídios de *C. graminicola* (Mims *et al.*, 1995).

6.3 CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DA GERMINAÇÃO

O contato direto da membrana plasmática com a superfície do celofane na região do poro (Fig. 18A) foi observado em outros fungos, como em *M. grisea* (Bourett & Howard, 1990) e *C. truncatum* (Van Dyke & Mims, 1991). A formação do poro pode envolver a digestão da parede celular, como sugerido em trabalhos anteriores com *C. graminicola* germinado sobre folhas de milho e aveia, embora nestes casos não tenha sido visualizado o contato direto da membrana plasmática com a superfície das folhas (Politis, 1976; Politis & Wheeler, 1973). O material elétron denso, presente na região abaixo da região do poro (Fig. 18B), pode apresentar enzimas que degradam celulose, uma vez que a constituição da membrana de celofane é celulósica. A participação de celulasas no processo de penetração em

membranas artificiais foi sugerida anteriormente (Suzuki *et al.*, 1982; Bourett & Howard, 1990). Além disso, inúmeros fungos secretam enzimas que digerem diferentes componentes celulares vegetais (Mendgen & Deising, 1993; Pascholati, 1995; Mendgen *et al.*, 1996). A participação de enzimas na penetração de *C. lindemuthianum* em hipocótilo de feijão foi sugerida (O'Connell *et al.*, 1985). A formação da hifa de penetração (Figs. 18C-18D) é muito semelhante ao descrito na literatura. Tanto o estadio inicial (Fig. 18C) quanto o estadio mais avançado da penetração (Fig. 18D) são similares ao observado em *C. lindemuthianum* germinado sobre hipocótilo de feijão (O'Connell *et al.*, 1985). Da mesma forma, similaridades são observadas quando comparada com fungos germinados sobre membranas artificiais. O estadio inicial é muito semelhante ao verificado durante a germinação de *C. truncatum* germinado sobre membrana de diálise (Van Dyke & Mims, 1991), enquanto o estadio mais avançado é similar ao observado durante a germinação de *M. grisea* sobre membrana de celofane (Bourett & Howard, 1990).

A organização intracelular do apressório é característica de célula eucariótica com intensa atividade metabólica. Numerosos ribossomos e polisomas livres indicam que há produção de proteínas para consumo interno, enquanto a presença de retículo endoplasmático rugoso sugere que também ocorre síntese de proteínas destinadas à exportação e formação de membranas (Fig. 19). O aumento da síntese protéica sempre acompanha o processo germinativo (Hoch & Staples, 1987).

A proeminente e abundante presença de vacúolos e vesículas no tubo germinativo e apressório (Figs. 17C, 17D, 18A, 19A) concorda com o postulado de que esta organela é altamente complexa e desempenha funções fundamentais para a fisiologia celular dos fungos (Gow & Gadd, 1995). A vacuolização em apressório de *C. graminicola* foi anteriormente demonstrada em conídios germinados sobre folhas de milho e aveia (Politis & Wheeler, 1973; Politis, 1976), e também *C. lindemuthianum* germinado sobre hipocótilo de feijão (O'Connell

et al., 1985). Similarmente, em outras espécies de fungos têm sido observados diferentes graus de vacuolização no apressório. Em *P. arachidis*, a medida que a infecção evolui, o apressório torna-se cada vez mais vacuolizado (Mims *et al.*, 1989). Da mesma forma observou-se em conídios *M. grisea*, germinados sobre membrana de celofane, formação de vacúolos no apressório (Bourett & Howard, 1989). Embora existam inúmeras constatações através de M. E. T., pouco é conhecido sobre a função desta organela nas estruturas de infecção. A quebra de macromoléculas é uma importante função dos vacúolos em fungos, embora possam desempenhar outros papéis, como armazenamento de substâncias e controle do pH do citosol (Klionsky *et al.*, 1990). A deposição do produto de reação para fosfatase ácida em vesículas do tubo germinativo e apressório (Figs. 25-27) é indicativa de atividade lítica (Yamamoto *et al.*, 1981; Sangwan *et al.*, 1989; Jordan & DeVay, 1990). Vacúolo/lisosoma é uma expressão muitas vezes usada para designar os vacúolos de levedura (Hirsch *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1997).

O apressório apresenta diferentes organizações da parede celular, quando comparado com o conídio não germinado e tubo germinativo. A delgada camada elétron densa adjacente à membrana plasmática no apressório (Fig. 20A) provavelmente representa melanina, aparecendo de forma muito semelhante à encontrada em *M. grisea* (Bourett & Howard, 1990; Howard & Ferrari, 1989) e descrita em outros fungos (Bell & Wheeler, 1986). A melanização do apressório (Fig. 15D) é também descrita para outras espécies de *Colletotrichum* (O'Connell *et al.*, 1985; Van Dyke & Mims, 1991). A melanina confere resistência ao estresse ambiental e é crucial na patogenicidade dos fungos que infectam plantas (Bell & Wheeler, 1986). Semelhantemente, em *Fonsecaea pedrosoi*, fungo patogênico de célula animal, foi sugerido que a melanina diminui a velocidade de fagocitose do patógeno pelos macrófagos e possivelmente participa na interação fungo-célula hospedeira (Farbiarz *et al.*, 1992).

A matriz extracelular (Fig. 20) também é observada em outros fungos e tem lhe sido atribuída a função de adesão (Mims & Richardson, 1989; Van Dyke & Mims, 1991; Chaubal *et al.*, 1991). Neste estudo, como pode ser observado especialmente nas figuras 20A e 20B, o material fibrilar parece, de fato, ser continuidade da parede celular. Semelhantemente, material estendendo-se da parede celular do apressório, na parte basal, e conectando-se à membrana de celofane está demonstrado em *M. grisea* (Bourett & Howard, 1990). Neste caso, os autores consideram este material como camadas da parede celular, e como material adesivo uma pequena camada elétron densa depositada na parte basal. Entretanto, a maioria dos autores consideram o material envolvendo o apressório como matriz extracelular, e não constituinte da parede celular (Mims & Richardson, 1989; Van Dyke & Mims, 1991; Chaubal *et al.*, 1991). Em *G. juniperi-virginianae* a matriz está presente no tubo germinativo e no apressório, e a medida que o apressório desenvolve-se, a matriz torna-se uma compacta rede elétron densa (Mims & Richardson, 1989). Semelhante matriz extracelular foi demonstrada em *C. truncatum* germinado sobre membrana de diálise (Van Dyke & Mims, 1991). Imagens do apressório deste fungo mostram o material fibrilar estendendo-se a partir da parede celular do apressório em formação, com morfologia muito semelhante à observada na figura 20. Após a completa melanização do apressório, este material condensa-se, formando uma cobertura elétron densa aderida à membrana de diálise.

No presente trabalho não foi encontrada a compacta matriz elétron densa observada em *G. juniperi-virginianae* (Mims & Richardson, 1989) e *C. truncatum* (Van Dyke & Mims, 1991). É possível que este material não seja preservado com a fixação química convencional utilizada, mas somente com a criofixação, utilizada pelos autores. Em *Puccinia sorghi*, a matriz extracelular é composta principalmente por uma glicoproteína rica em aminoácidos ácidos e um polímero de 1,3 - β - glucana, o qual parece ser responsável pela adesão (Chaubal

et al., 1991). Em *C. graminicola* foi sugerido que o material adesivo seja formado por uma proteína rica em manose (Sugui *et al.*, 1998).

A parede celular do conídio não germinado apresenta delimitação definida, e não verifica-se a presença de material extracelular (Fig. 17B). Observam-se duas camadas, com organização semelhante à descrita para conídios não germinados analisados através de criosubstituição (Mims *et al.*, 1995). Estudos anteriores demonstraram que conídios de *C. graminicola* são envoltos por mucilagem solúvel em água (Nicholson & Moraes, 1980; Nicholson *et al.*, 1986), sendo a mesma igualmente verificada através de criosubstituição (Mims *et al.*, 1995). De maneira semelhante, conídios de *C. truncatum* também apresentam-se recobertos por uma matriz extracelular (Van Dyke & Mims, 1991). A inexistência deste material em nossas preparações possivelmente deve-se ao método utilizado, o qual não preserva este tipo de substância. Por outro lado, a abundante matriz extracelular presente no apressório é preservada através da mesma metodologia. Assim a mucilagem do conídio não germinado e a matriz extracelular do apressório têm comportamento diferente quando sujeitas ao mesmo tratamento químico. Estes resultados sugerem que tratam-se de estruturas que podem apresentar composições químicas diferentes ou diferente associação com parede celular.

Conídios de *C. graminicola* germinam sobre diferentes superfícies, como vidro (Fig. 14), membrana de celofane (Fig. 17C) e membrana de acetato (Tabela 5 – pg. 122), indicando que o estímulo não é específico, como observado também em *M. anisopliae* (Leger *et al.*, 1989). A capacidade de *C. graminicola* germinar e penetrar em membrana de celofane, bem como a definição de condições que permitiram o processamento para M. E. T., estabelece um modelo útil para estudos ultraestruturais durante a germinação deste patógeno. Estudos semelhantes foram levados a cabo em membrana de diálise e membranas de celofane

com *C. truncatum* e de *M. grisea*, respectivamente (Van Dyke e Mims, 1991; Bourett e Howard, 1990).

6.4 ANÁLISE CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA

6.4.1 Fosfatase ácida no conídio não germinado

Uma vez padronizada a metodologia de processamento para M. E. T., tornou-se possível estudar, a nível de citoquímica ultraestrutural, a atividade da fosfatase ácida em *C. graminicola*. A presença da fosfatase ácida em vacúolos, verificada através da intensa deposição do produto de reação (Figs. 21-27), além de indicar ser este o principal sítio celular de hidrólise de ésteres de fosfato, sugere que estas organelas funcionam como compartimentos líticos. Fosfatase ácida associada a aspectos ultraestruturais é critério vastamente utilizado para a identificação geral de lisosomas (Novikoff, 1976; Nishizawa & Mori, 1980; Yamamoto *et al.*, 1981; Sangwan *et al.*, 1989; Farbiarz *et al.*, 1990; Jordan & DeVay, 1990; Gunawardana, 1992; Moriyasu & Oshumi, 1996), embora a constatação de outras moléculas seja necessária para a caracterização fina dos diferentes componentes deste sistema (Dunn, 1990a; 1990b; Lenk *et al.*, 1992). Vacúolos desempenham importante papel na degradação de componentes macromoleculares de levedura e outras células fúngicas (Wilson *et al.*, 1980; Klionsky *et al.*, 1990). Função lisosomal tem sido atribuída a vacúolos de vários fungos que apresentam esta enzima, como *S. cerevisiae* (Rijn *et al.*, 1975; Linnemans *et al.* 1977), *A. flavus* (Bojovic-Cvetic & Vujicic, 1982) e *P. cubensis* (Ruch & Motta, 1987). A digestão intravacuolar em fungos, concorda com a presença de uma variedade de enzimas hidrolíticas nestes compartimentos (Klionsky *et al.*, 1990; Baba *et al.*,

1992; Griffin, 1993). É importante considerar que vacúolos de fungos, embora possam ser considerados análogos a lisosomas de células animais, podem também exercer outras funções, como armazenamento de metabólitos, e manutenção da homeostase do pH e da concentrações de íons do citosol (Klionsky *et al.*, 1990; Griffin, 1993).

A presença do produto de reação da fosfatase ácida na superfície interna da membrana vacuolar (Fig. 21) constitui-se também em marcador útil no estudo da dinâmica deste compartimento, e permitiu demonstrar que os vacúolos internalizam corpos lipídicos. A localização de moléculas específicas nas membranas é critério utilizado no estudo do mecanismo da autofagia em células animais (Dunn, 1990a) e também em *S. cerevisiae* (Baba *et al.*, 1994). A internalização dos lipídios pelos vacúolos do conídios não germinado foi verificada tanto a nível de microscopia eletrônica (Fig. 22) quanto a nível de microscopia de luz (Fig. 16). A internalização de lipídios por vacúolos já havia sido sugerida na década de 70 em *P. aphanidermatum* (Ruben & Staghellini, 1978). Semelhantemente, a captação de lipídios pelos vacúolos seguida de digestão, foi sugerida em *B. cinerea* e *C. ulmi*, bem como de glicogênio em *E. wiconsinensis* (Wilson *et al.*, 1980). Da mesma forma, Kerrigan & Mims (1993) sugeriram a captação de lipídios em vacúolos de conídios velhos de *C. gloeosporioides*, embora o fato em si não tenha sido observado. Em nenhum destes casos foi feita marcação de membrana.

A captação de corpos lipídicos (Fig. 22) pelos vacúolos dos conídios não germinados é análoga a microautofagia. Neste processo, os componentes citoplasmáticos são diretamente introduzidos dentro do vacúolo ou lisosoma por invaginações ou protusões da membrana vacuolar ou lisosomal (Yuan *et al.*, 1997). O fenômeno da microautofagia, observado na presente tese, concorda com observações anteriores em células de plantas e fungos, embora esta terminologia não tenha sido empregada nestes casos. A invaginação do tonoplasto, em células vegetais, é observada de longa data (Matile, 1969) e está demonstrada em parênquima

de armazenamento durante a germinação (Herman *et al.*, 1981) e em células de raiz de cebola (Nishizawa & Mori, 1980). Em conídios velhos de *C. gloeosporioides*, embora o evento não tenha sido diretamente visualizado, as evidências sugerem que os vacúolos engolfam corpos lipídicos (Kerrigan & Mims, 1993). Além disso, os autores reportam vesículas denominadas "microbody-like structures", capazes de "fagocitar" corpos lipídicos, e sugerem que os mesmos poderiam, por sua vez, ser posteriormente "fagocitados" pelos vacúolos. A microautofagia (com esta denominação) foi recentemente verificada em leveduras. Tuttle e Dunn (1995) demonstraram que a degradação de peroxissomas em *P. pastoris* pode ocorrer em processo análogo a microautofagia, em meio com glucose, ou a macroautofagia, em meio etanólico. Neste fungo, a subunidade alfa da fosfofrutoquinase modula a regulação da microautofagia induzida por glucose (Yuan *et al.*, 1997). Na levedura mutante *pep-4*, quando células crescidas em meio sem glucose passavam a crescer em meio com glucose, verificou-se a degradação de peroxissomas através de microautofagia (Chiang *et al.*, 1996).

As mudanças observadas no material interiorizado (Fig. 22C) são indicativas de um processo digestivo. Alterações semelhantes foram usadas como parâmetros de atividade de digestão em vacúolos de fungos e de células vegetais (Wilson *et al.*, 1980; Herman *et al.*, 1981). A captação de estruturas citoplasmáticas pelos vacúolos, seguida de digestão, caracteriza um processo autofágico.

O conjunto de resultados indica que em conídios de *C. graminicola* os vacúolos desempenham função lítica. A internalização de corpos lipídicos e sua degradação intravacuolar provavelmente representam um mecanismo que permite compartimentalizar os processos hidrolíticos, e assim proteger o citoplasma de degradação pelas enzimas vacuolares, como sugerido por Wilson *et al.* (1981). Embora não haja dados experimentais, pode-se especular sobre a função geral do vacúolo no que se refere à digestão dos lipídios, conforme apresentado a figura 54. Especificamente em fungos, a compartimentalização das

reservas endógenas foi sugerida como parte do mecanismo que controla a dormência de esporos de *Myrothecium verrucaria* & *Trichoderma reesei* (Mandels, 1981).

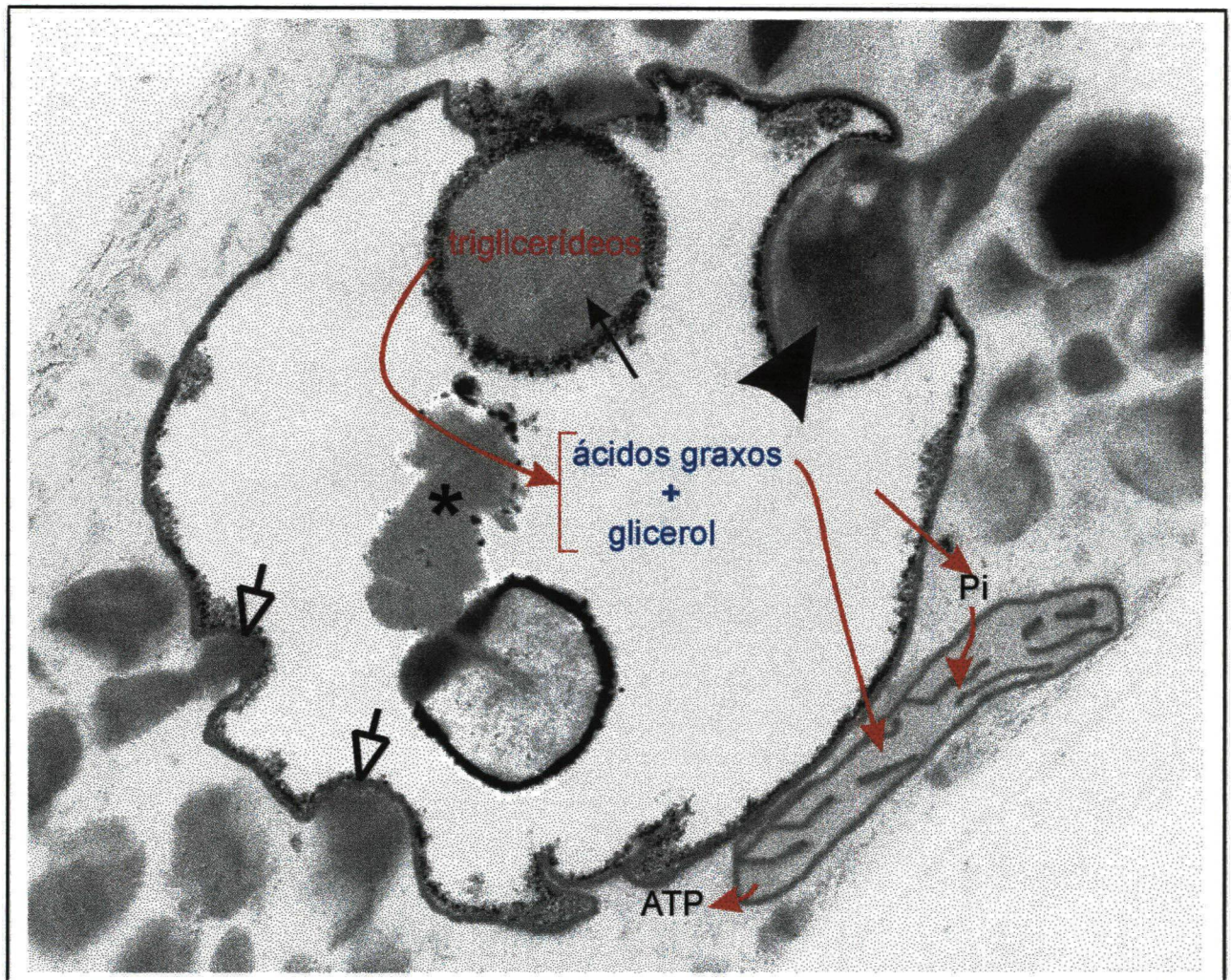


Figura 54 - Esquema especulativo do processamento dos lipídios pelos vacúolos.

Observa-se o início da internalização de corpos lipídicos (setas vazadas), estágio mais avançado do processo de internalização (ponta de seta), a vesícula recém formada (seta) e a vesícula apresentando rompimentos da membrana e descarregamento de seu conteúdo (estrela). Os triacilgliceróis são hidrolisados produzindo ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são então utilizados pela mitocôndrias para a produção de ATP. O vacúolo também pode estar produzindo fosfato inorgânico, o qual pode ser usado pela mitocôndria.

A microautofagia de outras estruturas celulares (Figs. 23A-23B) indica que a função hidrolítica nestes compartimentos é abrangente. Esta possibilidade está de acordo com observações anteriores demonstrando, *in vivo*, que conídios de *C. graminicola* acumulam vermelho neutro em vesículas que aparentemente são transferidas para o interior dos vacúolos (Leite, 1992). Outras reservas podem ser processadas pelos vacúolos, como a digestão de grânulos de glicogênio em *Elsinoe wiconsinensis* (Wilson *et al.*, 1981).

O presente estudo caracteriza a microautofagia, que é uma classe de autofagia. O modo de captação de material citoplasmático na microautofagia (Figs. 21B, 22A-22B) difere do tradicionalmente observado nos processos autofágicos. O mecanismo classicamente conhecido ocorre através do seqüestro de porções do citoplasma em vacúolos formados por dupla membrana, denominado autofagosoma, o qual funde-se com lisosomas ou vacúolos (Dunn, 1990a, 1990b; Aubert *et al.*, 1996). Este mecanismo tem sido denominado de macroautofagia (Aubert *et al.*, 1996; Baba *et al.*, 1997). Nas análises feitas neste trabalho não foram encontradas figuras sugestivas de macroautofagia, porém é possível a ocorrência da mesma em *C. graminicola*. Esta possibilidade baseia-se em observações que mostram vacúolos autofágicos, em conídios velhos, contendo organelas citoplasmáticas (Mims *et al.*, 1995). Da mesma forma, a macroautofagia está demonstrada em *S. cerevisiae* (Baba *et al.*, 1994; Takeshige *et al.*, 1992). Neste caso, observou-se que a depleção de nutrientes do meio induz a degradação não seletiva de porções do citoplasma. Quando a proteinase B é inibida por PMFS, os corpos autofágicos, apresentando uma membrana, acumulam-se no vacúolo (Takeshige *et al.*, 1992). O mesmo evento corre em mutantes que não expressam a preteínase

B (Baba *et al.*, 1994). A meia vida dos corpos autofágicos é muito curta, uma vez que, sem a presença de PMFS, os mesmos não são detectados no tipo selvagem (Takeshige *et al.*, 1992).

6.4.2 Fosfatase ácida durante a germinação

Os vacúolos do conídio aumentam durante a germinação, com concomitante deposição do produto da reação para fosfatase ácida, e apresentam resíduos celulares no seu interior (Fig. 24). A vacuolização durante a germinação também é observada através de microscopia de luz, verificando-se lipídios no interior dos vacúolos (Fig. 16). O conjunto destes resultados sugere processo autofágico, o que está de acordo com dados da literatura. A autofagia em células animais submetidas a extensivo remodelamento celular está bem documentada (Gunawardana, 1992; Bucher & Hofer, 1993; Hakaby *et al.*, 1994). Em outros tipos celulares o fenômeno também tem sido observado. Por exemplo, em *D. discoideum* os vacúolos autofágicos têm importante papel no processo de diferenciação celular (Yamamoto *et al.*, 1981). A atividade específica da fosfatase ácida aumenta e a estrutura da enzima sofre modificações pós-traducionais durante o processo de diferenciação, bem como novas isoenzimas são sintetizadas (Knecht *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1985). Em vegetais, recentemente foi demonstrado aumento da autofagia em células de tabaco cultivadas em meio deficiente de glucose (Moriyasu & Oshumi, 1996). Neste caso ocorre aumento da fosfatase ácida, demonstrada por método espectrofotométrico, sendo que a enzima está presente em vesículas, determinada através e método citoquímico.

A presença de vacúolos apresentando fosfatase ácida no tubo germinativo (Fig. 25), com imagens que sugerem o fenômeno da microautofagia, indica que os vacúolos nesta estrutura provavelmente apresentam as mesmas características dos vacúolos do conídio. Além disso, em células vivas os vacúolos do tubo germinativo também apresentam o fenômeno de captação do vermelho neutro (Fig. 35), demonstrando o mesmo comportamento de vacúolos

de conídios (Fig. 34). O tubo germinativo pode apresentar lipídios (Fig. 15B). Portanto, se a via de metabolização desses compostos envolve a passagem pelos vacúolos, considerando a grande necessidade de energia na formação do tubo germinativo, é lógica a presença de vacúolos que efetuam a microautofagia nessa estrutura de infecção. Em detalhado estudo ultraestrutural do tubo germinativo de *U. phaseoli* observa-se a presença de lipídios, de pequenos vacúolos que parecem interconectados, e de grandes vacúolos (Hoch & Staples, 1983). Embora os autores não tenham efetuado nenhuma determinação citoquímica, os mesmos consideram os vacúolos fazendo parte do sistema lisosomal do fungo.

No apressório, a proximidade entre vesículas e corpos lipídicos e a presença de material lipídico dentro destas vesículas (Figs. 26-27) sugerem envolvimento destes compartimentos no metabolismo de lipídios. A heterogeneidade destas organelas concorda com a natureza dinâmica dos compartimentos líticos de diferentes organismos (Herman *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 1981; Dunn, 1990a, 1990b; Lenk *et al.*, 1992). Provavelmente as vesículas marcadas no apressório correspondam às observadas anteriormente através de M.E.T. em apressório de *C. graminicola* (Figs. 17C-17D). As diferenças finas verificadas podem ser devidas, em parte, às diferenças na metodologia e podem estar relacionadas ao estágio de maturação no momento do processamento celular.

Embora não tenham sido encontradas referências na bibliografia sobre a função de vesículas ou vacúolos no apressório, na célula haustorial mãe em *P. arachidis* foi observada a agregação de corpos lipídicos, microcorpos e estruturas membranosas, com aparente quebra dos corpos lipídicos dentro das estruturas membranosas (Mims *et al.*, 1989). Não foi encontrada nenhuma informação na bibliografia sobre a presença de fosfatase ácida em vacúolos do conídio germinado, tubo germinativo ou vesículas do apressório.

No apressório, o produto de reação de fosfatase ácida não é restrito ao sistema vacuolar, mas também está presente em vesículas de secreção e matriz de extracelular (Fig.

29-30). Fungos e leveduras secretam fosfatase ácida (Nahas *et al.*, 1982; Han *et al.*, 1994) e apresentam a mesma na parede celular e espaço periplasmático (Linnemans *et al.*, 1977; Bojovic-Cvetic e Vujicic, 1982; Tronchin *et al.*, 1989). A enzima secretada hidrolisa ésteres de fosfato resultantes da degradação de compostos orgânicos na natureza (Nahas, 1989). Especificamente, durante germinação, foi demonstrado que a fosfatase ácida é secretada em *N. crassa* (Nahas, 1989). Em *C. albicans* a atividade desta enzima desaparece da superfície conidial e aparece na parede celular do tubo germinativo (Tronchin *et al.*, 1989). Estes autores sugeriram que a enzima possa ser envolvida em defosforilação de fosfoproteínas durante reorganização de parede celular.

Em contraste com a escassez de informações sobre fosfatase ácida durante a germinação em fungos, durante a germinação em sementes de vegetais a esta enzima tem sido extensivamente estudada. É possível que na germinação de *C. graminicola* ela desempenhe papel semelhante ao sugerido em vegetais. Aumento da atividade enzimática está demonstrada durante a germinação de sementes de vários vegetais (Rossi *et al.*, 1981; Pitel & Cheliak, 1986; Bhargava & Sachar, 1987; Sekhar & DeMason, 1989; Kummerová & Buresová, 1990; Bose & Taneja, 1998) e a ela tem sido sugerido papel chave no desenvolvimento celular (Biswas & Cundiff, 1991). Em *V. sinensis* os autores sugerem que a presença de isoenzimas aumenta a capacidade de reciclar o fosfato durante a proliferação das células embrionárias (Biswas e Cundiff, 1991). Em *Agrostemma githago* e *Vaccaria pyramidata*, sugere-se que a síntese de DNA nas sementes em germinação esteja ligada a um processo regulatório que ativa a síntese de enzimas hidrolíticas, como a fosfatase ácida, necessárias para a quebra das reservas endógenas (Bernhardt *et al.*, 1993).

A ampla distribuição da fosfatase ácida durante a germinação de *C. graminicola* sugere que esta enzima tem importante papel neste processo, à semelhança das células vegetais, como exposto no item anterior. Essa hipótese é reforçada pela inibição da

germinação pelo fluoreto de sódio, inibidor da fosfatase ácida (Fig. 31). A fosfatase ácida do homogenato de *C. graminicola* é totalmente inibida *in vitro* quando incubada com fluoreto de sódio 2 mM e analisada por métodos espectrofotométricos (resultados não mostrados). Fluoreto é inibidor vastamente utilizado no estudo de fosfatase ácida (Panara *et al.*, 1990; Biswas & Cundiff, 1991; Pasqualini *et al.*, 1992; Famurewa & Olutiola, 1994) mas pode também inibir outras enzimas, como, por exemplo, fitase (Kasho *et al.*, 1982; Chelius & Wodzinski, 1994). Assim, parte da inibição observada pode ser devida à inibição de outros processos também essenciais na germinação. Entretanto, a reversão da inibição pela adição de fosfato (Fig. 32) sugere que a principal enzima inibida é produtora de fosfato. Uma vez que o papel fisiológico da fosfatase ácida tem sido relacionado à produção de fosfato inorgânico (Trimble *et al.*, 1981; Barbarié *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1989; González *et al.*, 1993), pode-se sugerir que em *C. graminicola* provavelmente a enzima desempenha o mesmo papel. Este papel pode estar relacionado também a fosfatos armazenados. Por exemplo, fosfatase ácida pode hidrolisar formas de armazenamento de fosfato, como Ca-fitato em associação micorriza-raiz (Pasqualini *et al.*, 1992). Também em *A. niger* atribui-se à fosfatase ácida papel na defosforilação do fitato em conjunto com a ação de uma fitase (Zyta, 1993).

6.5 A CAPACIDADE DE ENDOCITOSE

A capacidade de endocitose em conídios não germinados de *C. graminicola* é sugerida por imagens a nível de M. E. T. (Fig. 33) e está de acordo com o conhecimento clássico deste fenômeno. Alguns estudos abordam a endocitose em fungos. Análises ultraestruturais em *B. cinerea*, na presença de vermelho neutro, demonstram a formação de numerosas invaginações na membrana plasmática sugerindo processo endocítico (Wilson *et al.*, 1980). Em *S. cerevisiae* estudos mais avançados têm sido feitos; o ferormônio fator- α liga-se ao seu

receptor, e desencadeia a internalização do complexo, que após passagem pelo sistema endosomal é dirigido ao vacúolo para degradação (Chvatchko *et al.*, 1986; Dulic & Riezman, 1989). Em leveduras do tipo selvagem está demonstrado que o transportador para galactose (Gal2P) e a ATPase, ambas proteínas da membrana plasmática, são degradadas no vacúolos, quando as células passam de meio sem glucose para meio com glucose (Chiang *et al.*, 1996). Está também demonstrado que a proteína pan1p desempenha função como adaptador multivalente proteína-proteína no processo de endocitose (Wendland & Emr, 1998).

6.6 CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO: A DINÂMICA DOS VACÚOLOS EM CONÍDIOS VIVOS

Os resultados citoquímicos ultraestruturais (Figs. 21-23) e de microscopia de luz (Fig. 16) indicam que os vacúolos de *C. graminicola* são estruturas dinâmicas capazes de internalizar componentes citoplasmáticos. Com a finalidade de verificar este fenômeno também na célula viva, analisou-se a captação do vermelho neutro em conídios vivos, não germinados e germinados, sem a interferência dos processos de fixação que poderiam causar artefatos.

A captação do vermelho neutro foi previamente descrita em conídios de *C. graminicola* (Leite, 1992). A presença do corante em vesículas no interior de vacúolos após 15 minutos de incubação foi demonstrada e usada como parâmetro para a análise da vacuolização do conídio durante o envelhecimento (Leite, 1992). No presente estudo, os tempos de análise permitiram verificar com mais detalhes a dinâmica da incorporação do corante. A figura 34 mostra a seqüência da transferência do corante para o interior do vacúolo de conídios com 25 dias de idade. A ausência de vesículas contendo o corante na periferia do citoplasma, nos segundos após a exposição dos conídios ao mesmo (Figs. 34, B-D), concorda

com a difusão passiva da molécula através da membrana plasmática (Lowe *et al.*, 1995). Este mesmo tipo de captação é sugerido no fungo *Trichophyton mentagrophytes* (Naka *et al.*, 1995). Entretanto, após um tempo maior de exposição, verifica-se a presença de pequenas vesículas coradas no citoplasma próximas aos vacúolos (Fig. 34G), sugerindo que o acúmulo do corante ocorre principalmente em vesículas citoplasmáticas, as quais seriam então transferidas para os vacúolos. A internalização de vermelho neutro primeiramente em vesículas e a transferência destas para o interior do vacúolo foi observado *C. ulmi* a nível de microscopia de luz (Wilson *et al.*, 1980).

O acúmulo de vesículas intensamente coradas no interior dos vacúolos, e a fusão das vesículas intravacuolares contendo o vermelho neutro (Fig. 34B-C, 34F-G), corroboram a complexidade desta organela e do sistema vacuolar deste fungo. Dentre as várias funções que estas organelas podem desempenhar (Klionsky *et al.*, 1990) atribui-se função de detoxificação de substâncias estranhas para as células (Wilson *et al.*, 1981). Os autores postulam que a compartimentalização de substâncias tóxicas no vacúolo, onde podem ser hidrolisadas e detoxificadas, representa uma importante linha de defesa contra toxinas, incluindo fungicidas.

A captação do vermelho neutro pelos vacúolos do conídio germinado (Fig. 35) demonstra que neste estadio ainda são estruturas ativas e dinâmicas. Eventualmente, perdem esta capacidade (Fig. 35C), sugerindo que já houve morte celular. Assim, aparentemente, a medida que o processo germinativo avança, o conídio germinado perde a sua função metabólica.

6.7 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTRUTURA DA FRAÇÃO MICOSPORINA

A identificação de micosporina em conídios de *C. graminicola* está em concordância com a presença de micosporina-alanina verificada anteriormente na mucilagem destes

conídios (Leite & Nicholson, 1992). A existência de micosporinas em outros fungos foi reportada em inúmeros trabalhos (Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Arpin *et al.*, 1979; Arpin & Bouillant, 1988; Bernillon *et al.*, 1984; Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Compostos com absorvância em 310 nm têm sido relatados em fungos desde a década de 60 (Leach, 1965; Trione *et al.*, 1966), isolados principalmente de micélios em esporulação (Fayret & Vito, 1981; Pittet *et al.*, 1983c; Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Buscot & Bernillon, 1991). Designados genericamente pelo termo "micosporinas", são solúveis em água e são constituídos pela condensação de uma ciclohexanona substituída e um aminoácido, aminoálcool ou derivado glucosídico de aminoálcool (Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Arpin *et al.*, 1979; Bernillon *et al.*, 1984) (Tabela 1-pg. 25 e tabela 2-pg. 27; Fig. 39, pg. 92). Foram identificadas em 21 espécies de fungos citados em uma revisão sobre micosporinas por Arpin *et al.* (1979), entre fungos imperfeitos, ascomicetos e basidiomicetos. Na tabela 6 (pg. 151) estão listadas praticamente todas as micosporinas caracterizadas estruturalmente, através de técnicas clássicas, como RMN, espectrometria de massa e de infravermelho. Na década de 90 houve um arrefecimento da pesquisa com esta classe de compostos, sendo que a mais nova micosporina descrita apresenta alanina e foi identificada na mucilagem de conídios de *C. graminicola* com a função de inibidor de germinação em conídios jovens (Leite & Nicholson, 1992). A mesma micosporina apresentou efeito de estimulação da germinação em conídios velhos (Leite, 1992).

Nos processos de isolamento de micosporinas tem-se usado diferentes tipos de resinas de troca iônica, seguidas ou não por gel filtração e/ou HPLC. Como exemplo pode-se citar o uso de QAE Sephadex A-25 (aniônica) seguida de SP Sephadex C-25 (catiônica) e HPLC (Bernillon *et al.*, 1990). Nas condições do presente trabalho, a extração metanólica seguida do uso de DEAE-Sephadex A-50 e Sephacryl S-200 produziu uma fração com espectro no UV (Fig. 36) semelhante aos espectros de absorção no UV verificados para compostos P310

anteriormente purificados (Trione & Leach, 1969). Este espectro é praticamente idêntico ao da micosporina-glutamina caracterizada em *Ascochyta fabae* (Pittet *et al.*, 1983b), porém ligeiramente diferente da micosporina-alanina, conforme observado na figura 55.

A comparação com o espectro de absorção do UV da micosporina-alanina só foi possível a partir de 240 nm, uma vez que não se dispõe das regiões anteriores do espectro (Leite & Nicholson, 1992; Leite, 1992). Os espectros sugerem que tratam-se de substâncias semelhantes, porém algumas diferenças foram observadas. O método de isolamento utilizado neste trabalho, empregando extração com metanol seguida das separações cromatográficas, não confirmou a presença do ombro observado no espectro da micosporina-alanina (Fig. 55). Além disso, o pico máximo de absorção é 313 nm, enquanto o da micosporina-alanina purificada da mucilagem dos conídios por Leite & Nicholson (1992) foi 310 nm. Detecção em 313 nm de outras micosporinas, apresentando os radicais glutaminol e glutamicol, tem sido reportada (Lemoyne *et al.*, 1985). Micosporina-alanina também foi detectada em 313 nm nas análises de HPLC (Leite & Nicholson, 1992).

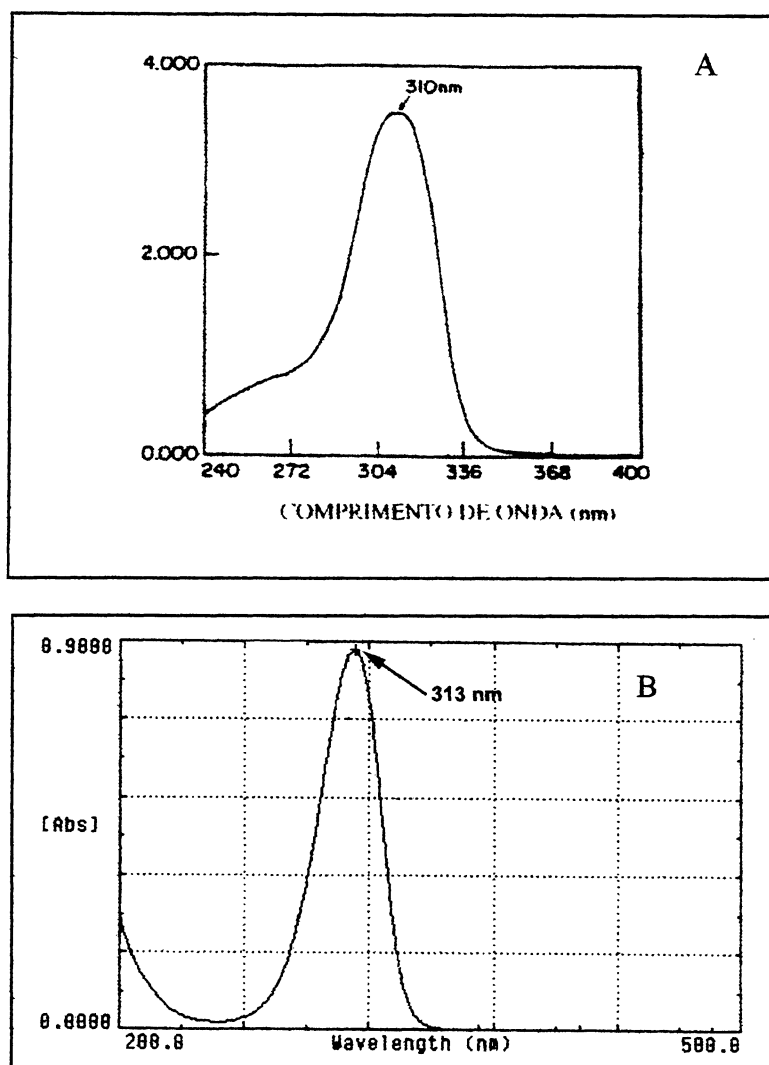


Figura 55 - Comparação dos espectros de UV da micosporina-alanina e da fração micosporina.

Em A observa-se o espectro da micosporina-alanina (figura adaptada de Leite & Nicholson, 1992). Em B observa-se o espectro de absorção da fração micosporina, cuja estrutura química sugerida ao principal composto da fração é micosporina-glutamina. Absorção máxima em A = 310 nm e em B = 313 nm.

Os trabalhos relatando caracterização estrutural de micoporinas estão listados na tabela 6 (pg. 151). A estrutura da maioria destes compostos foi determinada na década de 70 e início dos anos 80, através das técnicas espectrofotométricas clássicas utilizadas na caracterização de compostos orgânicos, como ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, espectrometria de massa e de infravermelho. Embora a fração micoporina isolada seja heterogênea, o conjunto das diferentes análises de ESI-MS, RMN e FTIR permitiram efetuar uma análise preliminar da estrutura química do principal composto da fração, detalhada no item 5.12. O conjunto destas análises sugere que a estrutura química do principal composto da fração corresponda à micoporina-glutamina (Fig. 56).

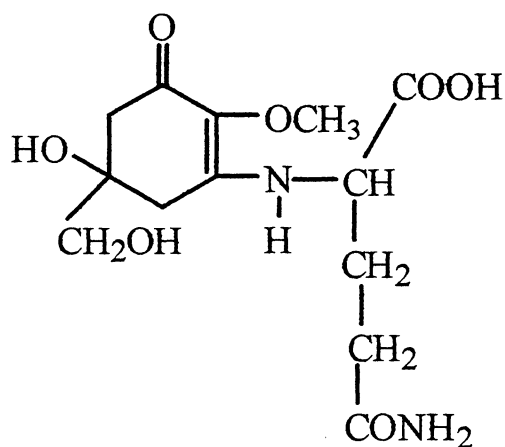


Figura 56 - Estrutura química da micoporina-glutamina, provável composto em maior concentração na fração micoporina isolada.

Esta estrutura, micosporina-glutamina, está de acordo com a estrutura da maioria das micosporinas isoladas em fungos, as quais apresentam ácido glutâmico ou são derivadas do mesmo, como descrito nas tabelas 2 (pg. 27) e 6 (pg. 151). A presença de micosporina-glutamina foi observada em *P. omphalodes* e *G. cingulata*, através de técnicas de espectrometria de massa (Bernillon *et al.*, 1984). Em *G. cingulata*, estágio sexual de *C. gloesporioides*, a presença de micosporina-ácido glutâmico já havia sido determinada (Young & Patterson, 1982). Micosporina-ácido glutâmico reduzido (micosporina-glutamicol) é encontrada em *T. roseum* e *G. leptostyla* (Pittet *et al.*, 1983a; Fayret & Vito., 1981) a qual, pela perda de uma molécula de água e ciclização, produz o ácido piroglutâmico reduzido, como observado em *B. cinerea*, *T. roseum*, *G. leptostyla* (Pittet *et al.*, 1983a; Fayret & Vito, 1981). Em organismos marinhos foram observadas outras micosporinas, como a micosporina glicina em *Chondrus yendoi* (alga) (Tsujino *et al.*, 1978) e *Oalythoa tuberculosa* (zoantideo) (Ito e Hirata, 1977).

A espectrometria de massa é uma das análises utilizadas na determinação estrutural de micosporinas, juntamente com as demais análises espectroscópicas (Tabela 6, pg. 151). A micosporina-alanina, presente na mucilagem de *C. graminicola*, foi caracterizada através desta técnica (Leite & Nicholson, 1992). Após derivatização e CI-MS os autores demonstraram fragmentos sugerindo a estrutura da micosporina-alanina, apresentando três picos principais: m/z 186 (ciclohexanona substituído), m/z 258 (micosporina-alanina, peso molecular = 259,1) e m/z 332,15 (micosporina-alanina derivatizada apresentando trimetilsilil).

Micosporina	Fungo	Caracterização	Referência
Micosporina serinol	<i>Stereum hirsutum</i>	¹³ C NMR ¹ H NMR IV MS	Favre-Bonvin <i>et al.</i> , (1976) referido como micosporina serinol por Bernillon <i>et al.</i> , 1984
Micosporina-alanina	<i>Colletotrichum graminicola</i>	MS	Leite & Nicholson, (1992)
Micosporina-ácido glutâmico	<i>Glomerella cingulata</i> <i>Helvellea leucomellanea</i> <i>Morchella esculenta</i>	¹³ C NMR ¹ H NMR TLC MS	Young & Patterson, (1982) Bernillon <i>et al.</i> , (1984) Buscot & Bernillon, 1991
Micosporina-ácido glutâmico derivado de glucosil	<i>Trichothecium roseum</i>	¹³ C NMR ¹ H NMR MS	Pittet <i>et al.</i> , (1983a)
Micosporina ácido-glutâmico-reduzido	<i>Trichothecium roseum</i> <i>Gnomonia leptostyla</i>	¹³ C NMR ¹ H NMR MS ¹ H NMR MS	Pittet <i>et al.</i> , (1983a) Fayret & Vito, (1981)
Micosporina-ácido piroglutâmico reduzido	<i>Gnomonia leptostyla</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Trichotecium roseum</i>	¹ H NMR MS ¹³ C NMR ¹ H NMR MS ¹³ C NMR ¹ H NMR MS	Fayret & Vito, (1981) Arpin <i>et al.</i> , (1977) Pittet <i>et al.</i> , (1983a)
Micosporina-ácido-piroglutâmico-derivado de glucosil	<i>Cladosporium herbarium</i> <i>Sptoria nodorum</i> <i>Ascochyta pisi</i>	MS HPLC	Bouillant <i>et al.</i> , 1981
Micosporina-glutamina	<i>Pyronema omphalodes</i>	MS	Bernillon <i>et al.</i> , (1984)

Tabela 6 - Micosporinas purificadas e caracterizadas estruturalmente em fungos.

Fungos podem apresentar mais de uma forma de micosporina. A micosporina-ácido piroglutâmico reduzido é a principal forma observada em *G. leptostyla* (95%), enquanto a forma aberta, micosporina-ácido glutâmico, ocorre em menor proporção (Fayret & Vito, 1981). Em *S. hirsutum* foram identificadas micosporina-serinol e micosporina-serina (Favre-Bonvin *et al.*, 1976; Arpin *et al.*, 1979) e em *M. esculenta* observou-se a presença de micosporina-ácido glutâmico e micosporina-glutamina (Buscott and Bernillon, 1991). Diferentes micosporinas podem ser características de determinadas estruturas miceliais em um mesmo fungo. A quantidade de micosporina-ácido glutâmico e micosporina-glutamina em *M. esculenta* varia, dependendo da estrutura fúngica analisada (Buscot e Bernillon, 1991). Por exemplo, no himênio maduro o derivado glutamina encontra-se em maior quantidade, enquanto o derivado ácido glutâmico está presente em uma quantidade muito menor. Assim, um fator que pode ser o determinante dos resultados encontrados refere-se à localização da micosporina na célula conidial.

Na presente tese utilizou-se a extração com metanol, um método extrativo diferente daquele utilizado por Leite & Nicholson (1992). Extrações com álcool e metanol são as mais freqüentemente reportadas nos métodos extrativos de micosporinas (Trione & Leach, 1969; Tsujino *et al.*, 1978; Bouillant *et al.*, 1981; Young & Patterson, 1982; Pittet *et al.*, 1983b; Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Buscot & Bernillon, 1991). O tratamento com metanol implica na permeabilização celular e extração de moléculas intracelulares. A localização intracelular do composto extraído também é sugerida pela elevada absorção no homogenato celular ($Abs_{310nm} = 4,5$) obtido através da fragmentação com pérolas de vidro, e baixa absorção na extração aquosa de conídios intactos ($Abs_{310nm} = 0,2$), ou seja, na mucilagem (Mercure *et al.*, 1994). A localização intracelular de micosporinas tem sido relatada em vários fungos (Dehorter, 1976; Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Arpin & Bouillant, 1988). Além disso, a captação, pelo micélio, de micosporina exógena adicionada a culturas tem sido observada. Em *A. fabae*, tanto a

micosporina-glutamina e seu derivado glucosil como a micosporina-ácido glutâmico penetram no micélio cultivado no escuro (o qual não produz micosporina), atingindo valores compatíveis com os níveis intracelulares de culturas cultivadas no claro (Pittet *et al.* 1983c). Em contrapartida, a micosporina-alanina está presente somente na mucilagem, não sendo detectada nenhuma absorbância em 310 nm nos conídios rompidos por ultra-som (Leite & Nicholson, 1992). Especificamente na mucilagem, além de micosporina-alanina em *C. graminicola* (Leite e Nicholson, 1992), também foi identificada a presença micosporina-ácido glutâmico na mucilagem de conídios de *G. cingulata*, estágio sexual de *C. gloesporioides* (Young & Patterson, 1982).

Além dos fatores expostos acima, é possível que as condições de cultivo tenham influenciado a produção de outra micosporina em conídios de *C. graminicola* no presente trabalho. As culturas do fungo utilizado neste trabalho não foram mantidas exatamente nas mesmas condições daquelas utilizadas por Leite (1992), e variações nas condições de cultivo, do meio e da idade podem afetar profundamente a fisiologia e o metabolismo secundário de fungos (Griffin, 1993; Gow e Gadd, 1995). As culturas das quais a micosporina foi isolada por Leite (1992) foram mantidas a 20° C, enquanto as culturas usadas na presente tese foram mantidas na faixa entre 22-28° C. O metabolismo fúngico é extremamente sensível a variações de temperatura. Por exemplo, *G. leptostyla* mantidas a 20° C produzem macroconídios e as culturas mantidas a 10° C produzem microconídios (Fayret & Vito, 1981). Além disso, micosporina-alanina foi extraída de um “pool” da mucilagem obtida de conídios de diferentes idades (comunicação pessoal) enquanto no presente trabalho utilizaram-se somente culturas de 14-15 dias. Outro fator a ser considerado é o meio utilizado. Macro e micronutrientes, especialmente zinco, mas também ferro e cobre, afetam o metabolismo secundário, com efeitos inibitórios ou estimulantes (Griffin, 1993). É provável que a aveia comercial dos EUA

apresente diferenças em sua composição, quando comparada a aveia Quaker, produzida no Brasil e utilizada no presente estudo.

6.8 EFEITOS BIOLÓGICOS DA FRAÇÃO MICOSPORINA

Nenhum efeito da fração micosporina isolada sobre a germinação de conídios germinados sobre membrana de acetato foi observado (Tabela. 5), contrariamente à ação da micosporina-alanina, a qual inibe a germinação de conídios com 15 dias de idade (Leite & Nicholson, 1992). Somente estudos adicionais poderão esclarecer devidamente esta questão. Entretanto, é possível que os efeitos observados devam-se a diferenças referentes às estruturas químicas. A micosporina-glutamina, provável principal micosporina presente na fração, difere estruturalmente da micosporina-alanina encontrada por Leite & Nicholson, (1992). Essas diferenças podem determinar a função biológica. Além disso, estão localizadas em sítios celulares diferentes. A primeira parece localizar-se predominantemente no interior celular enquanto a segunda foi extraída da mucilagem, material extracelular. A primeira apresenta o radical com cinco carbonos, semelhante a outras micosporinas comuns em fungos (Tabela 2 – pg. 27) sendo que algumas delas com efeito esporogênico determinado (Dehorter & Bernillon, 1983). A segunda, radical com três carbonos, à semelhança de micosporina-serinol, a primeira micosporina a ser isolada, e que também apresenta efeito esporogênico (Dehorter & Bernillon, 1983).

Poucas informações estão disponíveis sobre a ação de micosporinas no processo germinativo. A relação entre germinação e micosporina foi estudada somente em *C. graminicola* (Leite & Nicholson, 1992) e em *A. fabae*, que apresenta micosporina-ácido glutâmico (Pittet *et al.*, 1983c). Neste fungo foi observado que os níveis de micosporina, após 80 horas de germinação, aumentam quase três vezes em relação o conteúdo inicial do

composto. Os autores concluem que a micosporina não é consumida no curso da germinação (Pittet *et al.*, 1983c).

Outros efeitos biológicos têm sido atribuídos a micosporinas. A atividade esporogênica é a função biológica mais bem estudada das micosporinas, conhecida desde os primórdios das investigações nesta classe de compostos (Leach, 1965; Trione *et al.*, 1966; Trione & Leach, 1969). Os estudos mais abundantes sobre o efeito esporogênico foram desenvolvidos em *N. galligena*, cuja reprodução sexual necessita de luz (Dehorter, 1976; Dehorter *et al.*, 1980; Dehorter & Bernillon, 1983; Dehorter & Lacoste, 1989). Foi sugerido que a micosporina faz parte de um sistema fotorreceptor fúngico (Dehorter & Lacoste, 1989). Além da função esporogênica, atribui-se à micosporina-ácido glutâmico proteção dos esporos contra a ação germicida da radiação ultravioleta (280-320nm) em *G. cingulata* (Young & Patterson, 1982).

6.8.1 Considerações finais

O efeito (a) esporogênico atribuído a micosporinas relatado na literatura (Leach, 1965; Trione *et al.*, 1966; Trione & Leach, 1969, Dehorter, 1976; Dehorter *et al.*, 1980; Fayret & Vito, 1981; Pittet *et al.*, 1983; Dehorter & Bernillon, 1983; Dehorter & Lacoste, 1989), (b) auto-inibidor da germinação (Leite & Nicholson, 1992) e estimulador da germinação, dependendo da idade do conídios, verificados para a micosporina-alanina (Leite, 1992) e (c) de proteção contra radiação UV (Young & Patterson, 1982), bem como o (d) aumento da micosporina endógena no curso da germinação (Pittet *et al.*, 1983c), são indicativos da complexidade fisiológica de ação desta classe de compostos. A acumulação destes compostos em algas (Tsujino *et al.*, 1978) e em peixes (Chioccarra *et al.*, 1980) tornam ainda mais intrigante o seu papel e sugerem uma função biológica mais abrangente. Assim, a presente tese é somente o começo de uma investigação maior no que se refere a obtenção de

uma fração pura e a investigação de efeitos biológicos desta classe de compostos em conídios de *C. graminicola*.

7 CONCLUSÕES

A análise do conjunto de resultados obtidos na presente tese permitiu concluir que:

- a) O fungo *Colletotrichum graminicola* apresenta a atividade da fosfatase ácida localizada em vacúolos dos conídios não germinados, tubo germinativo e apressório.
- b) Os vacúolos dos conídios não germinados efetuam a microautofagia de lipídios armazenados e de outras estruturas citoplasmáticas.
- c) Os corpos lipídicos desaparecem do conídio não germinado com concomitante vacuolização e deposição de fosfatase ácida no vacúolo durante o processo germinativo.
- d) Os conídios de *Colletotrichum graminicola* germinam sobre a membrana de celofane e penetram na mesma. Este sistema é passível de processamento para M. E. T., constituindo-se em um modelo útil no estudo da germinação deste fungo. Através deste sistema observou-se que o apressório apresenta típica organização citológica de célula eucarionte.
- e) A extração metanólica seguida dos processos cromatográficos de DEAE-Sephadex A-50 e Sephacryl S-200 produz uma fração heterogênea. A avaliação preliminar da estrutura desta fração, através de técnicas de ESI-MS, RMN e FTIR sugerem que a fração isolada apresenta como principal componente a estrutura micosporina-glutamina.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, A. C; YOUNG, M. R. In: DINGLE, J., T.; DEAN, R. T. **Lysosomes in Biology and Pathology**, North-Holland Publishing Company – Amsterdam, London, v. 2, p. 620-625, 1969.
- ARNOLD, W. N.; GARRINSON, R. An Fe^{3+} activated acid phosphatase in *Saccharomyces rouxii*. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 4919-4924, 1979.
- ARPIN, N.; BOUILLANT, M. L. Metabólites secondaires fongiques: diversité de structures mais unités de fonction, la protection. **Cryptogam. Mycol.**, v. 9, p. 267-276, 1988.
- ARPIN, N.; CURT, R.; FAVRE-BONVIN, J. Mycosporines: mise au point et données nouvelles concernant leurs structures, leur distribution, leur localisation et leur biogénese. **Rev. Mycol.**, v. 43, p. 247-257, 1979
- ARPIN, N; FAVRE-BONVIN, J.; THIVEND, S. Structure de la mycosporine 2, nouvelle molécule, isolée de *Botrytis cinerea*. **Tetrahedron Letters.**, v. 10, p. 819-829, 1977.
- ASSIS, J. S.; AMARAL, D. Study on the glyoxylic cycle in the basidiomycete. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 19, p. 43-48, 1976.
- AUBERT, S.; GOUT, E.; BLIGY, R.; MARTY-MAZARS, D.; BARRIEU, F.; ALABOUVETTE, J.; MARTY, F.; DOUCE, R. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cell subjected to carbon deprivation, control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. **J. Cell. Biol.**, v. 133, p. 1251-1263, 1996.
- BABA, M.; TAKESHIGE, K.; BABA, N.; OHSUMI, Y. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes; their characterization. **J. Cell. Biol.**, v. 124, p. 903-913, 1994.

- BABA, M.; OHSUMI, M.; SCOTT, V. S.; KLIONSKY, D. J.; OHSUMI, Y. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. **J. Cell Biol.**, v. 39, p. 1687-1695, 1997.
- BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J. A. and Jeger, M. J. eds. ***Colletotrichum: biology, pathology; control***. British Society for Plant Pathology. CAB International. p. 88-120, 1992,
- BARBARIÉ, S.; KOZULIÉ, B.; RIES, B.; MILDNER, P. Physiochemical and kinetic properties of acid phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 878-883, 1984.
- BAX, A.; SUBRAMANIAN, S. J. Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy. **Magn. Reson.**, v. 40, p. 321-324, 1983.
- BAX, A.; DAVIS, D. G. J. ¹³C-¹⁵N based two dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. **Magn. Reson.**, v. 65, p. 335-360. 1985.
- BAX, A.; GRIFFEY, R. H.; HAWKINS, B. L. Correlation of protein and nitrogen chemical shifts by multiple quantum NMR. **J. Magn. Reson.**, v. 55, p. 301-315, 1986.
- BAX, A.; SUMMERS, M. F. Proton and carbon assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 108, p. 2093-2094, 1986.
- BEATTIE, S. E.; STAFFORD, A. E.; KING JR., A. D. Reevaluation of the neutral lipids of *Tilletia controversa* and *Tilletia tritici*. **Lipids**, v. 28, 1041-1043, 1993.
- BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis; functions of fungal melanins. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 24, p. 411-451, 1986.
- BERNHARDT, D.; TRUTWING, A.; BERKHOLD, A. Synthesis of DNA and the development of amylase and phosphatase

- activities in cotyledons of germinating seeds of *Vaccaria pyramidata*. **J. Exp. Bot.**, v. 44, p. 261-699, 1993.
- BERNHARDT, D.; TRUTWIG, A.; BARKHOLD, A. Synthesis of DNA and the development of amylase and phosphatase activities in cotyledons of germinating seeds of *Vaccaria pyramidata*. **J. Experiment. Bot.**, v. 44, p. 695-699, 1993.
- BERNILLON, J.; BOUILLANT, M. L.; PITTET, J. L.; FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N. Mycosporine-glutamine and related mycosporines in the fungus *Pyronema omphalodes*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1083-1087, 1984
- BERNILLON, J.; PARUSSINI, E.; LETOUBLON, R.; FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N. Flavin-mediated photolysis of mycosporines. **Phytochemistry**, v. 29, p. 81-94, 1990.
- BHARGAVA, R.; SACHAR, R. C. Induction on acid phosphatase in cotton seedlings: enzyme purification, subunit structure and kinetic properties. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1293-1297, 1987.
- BISWAS, T.; CUNDIFF, C. Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2119-2125, 1991.
- BOJOVIC-CVETIC, D.; VUJICIC, R. Acid phosphatase and distribution in *Aspergillus flavus*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 79, p. 137-141, 1982.
- BOSE, S. K.; TANEJA, V. Induction of a germination specific, low molecular weight, acid phosphatase isoenzyme with specific phosphotyrosine phosphatase activity in lentil (*Lens esculenta*) seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 250, p. 629-634, 1998.
- BOUILLANT, M. L.; PITTET, J. L.; BERNILLON, J.; FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N. Mycosporines from *Ascochita fabae*, *Cladosporium herbarum* and *Septoria nodorum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 2705-2707, 1981.
- BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Can. J. Bot.**, v. 68, 329-342, 1990.

- BOWEN, I. D. & BRYANT, J. A. The fine structural localization of p-nitrophenyl phosphatase activity in the storage cells of pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons. **Protoplasma**, v. 97, p. 241-250, 1978.
- BOWMAN, E. J.; BOWMAN, B. J. Identification and properties of an ATPase of vacuolar membranes of *Neurospora crassa*. **J. Bacteriol.**, v. 151, p. 1326-1337, 1982.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROOK, P. J. Protective function of an ultraviolet-absorbing compound associated with conidia of *Glomerella cingulata*. **Neo Zealand J. Botany.**, v. 19, p. 299-304, 1981.
- BUCHER, F.; HOFER, R. Histological and enzyme histochemical changes in the kidney of male bulhead (*Cottus gobio*) during the spawning period. **J. Fish Biol.**, v. 42, p. 403-409, 1993.
- BUCHI, D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 24, p. 135-141, 1992.
- BUSCOT, F.; BERNILLON, J. Mycosporins and related compounds in field; cultured mycelial structures of *Morchela esculenta*. **Mycol. Res.**, v. 95, p. 752-754, 1991.
- CALTRIDER, P. G.; RAMACHANDRAN, S.; GOTLLIEB, D. Metabolism during germination; function of glyoxylate enzymes in uredospores of rust fungi. **Phytopathology**, v. 53, p. 86-92, 1963.
- CHAUBAL, R.; WILLMONT, V. A.; WINN, V. K. Visualization, adhesiveness, cytochemistry of the extracellular matrix produced by urediniospore germ tubes of *Puccinia sorghi*. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 2044-2054, 1991.

- CHELIUS, M. K.; WODZINSKI, R. J. Strain improvement of *Aspergillus niger* for phytase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 79-83, 1994.
- CHIANG, H.; SCHEKMAN, R.; HAMAMOTO, S. Selective uptake of cytosolic, peroxisomal and plasma membrane proteins into lysosome for degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 26, p. 9934-9941, 1996.
- CHIOCCARA, F; DELLA GALA, A.; DE ROSA, M.; NOVELLINO, E; PROTA, G. Mycosporine amino acids and related compounds from the eggs of fishes. **Bull. Soc. Chim. Bel.**, v. 89, p. 1101-1106, 1980.
- CHVATCHKO, Y.; HOWALD, I.; RIEZMAN, H. Two yeast mutants defective endocytosis are defective in pheromone response. **Cell**, v. 46; 355-364, 1986.
- CLARKE, N. A.; LAIDMAN, D. L. Using a semi-aqueous medium for the subcellular study of acid phosphatase in wheat aleurone tissue. **J. Exp. Bot.**, v. 42, p. 387-392, 1991.
- COOPER, J. W. **Spectroscopic techniques for organic chemists**. John Wiley & Sons, p 64-89, 1980.
- CRAMER, C. L.; VAUGHN, L. E.; DAVIS, R. H. Basic amino acids and inorganic polyphosphates in *Neurospora crassa*: independent regulation of vacuolar pools. **J. Bacteriol.**, v. 142, p. 945-952, 1980.
- CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPERS, M. **Organic structures analysis**. University Press, INC., Oxford, p. 68-93, 1998.
- CULLING, C. F. A. **Handbook of histopathological; histochemical techniques**. 3rd ed. Butterworth and Co. Ltd. London, United Kingdom, p. 361, 1983.
- DEHORTER, B. Induction des pérîtèces of *Nectria galligena* Bres. par um photocomposé mycélien absorbant à 310 nm. **Can. J. Bot.**, v. 54, p. 600-604, 1976.

- DEHORTER, B.; BERNILLON, J. Photoinduction des perithèces du *Nectria galligena*: production et activité photomorphogène des mycosporines. **Can. J. Bot.**, v. 61, p. 1435-1442, 1983.
- DEHORTER, B.; BROCCQUET, M. F.; ALAIS, J.; LABLACE-COMBIER, A.; MAQUESTIAU, A.; VAN, Y.; HARVERBEKE, R.; FLAMANG, R.; MISPREUVE, H. Influence de la lumière et de la mycosporine sur la composition stérolique du *Nectria galligena* au cours de la morphogenèse sexuée. **Pytochemistry**, v. 19, p. 2311-2315, 1980
- DEHORTER, B.; LACOSTE, L. Photo-induction sexuée du pyrénomycète *Nectria galligena*: influence de la mycosporine sur le rapport des activités NADP⁺-isocitrate déshydrogénase/isocitrate lyase. **Can. J. Bot.**, v. 67, p. 447-450, 1989.
- DITTMANN, J.; HARISH, G. An automated microtitre plate assay for acid phosphatase as a model system for studying the influence of small amounts of Hg 2+ ions on enzyme activity. **Med. Sci. Res.**, v. 23, p. 127-129, 1995.
- DULIC, V.; RIEZMAN, H. Characterization of the END1 gene required for vacuole biogenesis and gluconeogenic growth of budding yeast. **Embo J.**, v. 8, p. 1349-1359, 1989.
- DUNN, JR. W. A. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of autophagic vacuole. **J. Cell. Biol.**, v. 110, p. 1923-1933, 1990a.
- DUNN, JR., W. A. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuoles. **J. Cell. Biol.**, v. 110, p. 1935-1945, 1990b.
- EZAWA, T.; SAITO, M.; YOSHIDA, T. Comparasion of phosphatase in the intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* spp.; *Gigaspora* spp. **Plant Soil**, v. 176, p. 57-63, 1995.

- FAMUREVA, O.; OLUTIOLA, P. O. Acid phosphatase synthesis in *Aspergillus flavus*. **Folia Microbiol.**, v. 394, p. 750-480, 1994.
- FARBIARZ, S. R.; CARVALHO, T. U.; ALVIANO, C.; SOUZA, W. Fine structure and cytochemistry of interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, p. 373-383, 1990.
- FARBIARZ, S. R.; CARVALHO, T. U.; ALVIANO, C.; SOUZA, W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 265-273, 1992.
- FARKAS, G. L.; LEDINGHAM, G. A. The relation of self-inhibition of germination to the oxidative metabolism of stem rust uredospores. **Can. J. Microbiol.**, v. 5, p. 141-151, 1959.
- FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N.; BREVARD, C. Structure de la mycosporine (P-310). **Can. J. Chem.**, v. 54, p. 1105-1113, 1976.
- FAVRE-BONVIN, J.; BERNILLON, J.; SALIN, N.; ARPIN, N. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2509-2514, 1987.
- FAYRET, J.; VITO, J. Relations et production et localisation de mycosporine et morphogénèses reproductrices chez le pyrénomycète *Gnomonia leptostyla*. **Physiol. Plant.**, v. 51, p. 299-303, 1981.
- GALABOVA, D., TULEVA, B.; BALASHEVA, M. A rapid method for determination of acid phosphatase activity of whole yeast cells. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 161-163, 1993.
- GALABOVA, D. N.; VASILEVA-TONKOVA, E. S.; BALASHEVA, M. A. Comparison of the phosphate-repressible and constitutive acid phosphatases of *Yarrowia lipolytica*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 483-484, 1994.

- GASPAR, M. L.; POLLERO, R. J.; CABELLO, M. N. Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **JAOCS.**, v. 71, p. 449-452, 1994.
- GONZÁLEZ, F. J.; FAUESTE, C.; BURGUILLO, F. J.; DOMINGUEZ, A. Kinetic behavior of a repressible acid phosphatase of the yeast *Yarrowia lipolytica*: a comparative study between the solubilized enzyme, the enzyme bound to cell-wall fragments and the enzyme bound to intact cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1162, p. 17-27, 1993.
- GOTTLIEB, D.; RAMACHANDRAN, S. The nature of production of the glyoxylate pathway enzymes in germinating spores of *Penicillium oxalicum*. **Mycologia**, v. 52, p. 599-607, 1960.
- GOW, N. A. R.; GADD, G. **The growing fungus**. Chapman & Hall. London, p. 81-82, 1995.
- GRANT, P. T.; MIDDLETON, C.; PLACK, P. A.; THOMSON, R. H. The isolation of four aminocyclohexenimines (Mycosporines) and structurally related derivative of cyclohexane-1:3-dione (Gadusol) from the brine shrimp, *Artemia*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 4, p. 755-759, 1985.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**, John Wiley; Sons, Inc., Publication, p. 76-80, 375-378. 1994.
- GRIFFITHS, D. A.; CAMPBELL, W. P. Fine structure of conidial development in *Colletotrichum atramentarium*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 59, p. 483-489, 1972.
- GUNAWARDANA, V. K. Lysosomes in the seminiferous tubules of the domestic fowl as revealed by acid fosfatase activity. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 25, p. 91-96, 1992.
- HAKABY, R.; ZAKERI, Z.; LOCKHIN. Metabolic events during programmed cell death in insect labial glands. **Biochem. Cell Biol.**, v. 72, p. 597-601, 1994.

- HAN, S. W.; MICHELIN, M. A.; BARBOSA, J. E.; ROSSI, A. Purification; constitutive excretion of acid phosphatase in *Neurospora crassa*. **Phytochemistry**, 35, p. 1131-1135, 1994.
- HÄNSSLER, G. D. P.; MAXWELL.; MAXWELL M. D., Demonstration of acid phosphatase-containing vacuoles in hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. **J. Bacteriol.**, v. 124, p. 997-1006, 1975.
- HATANO, T.; TSUCHIYA, E.; MYAKAWA, T.; FUKUI, S. Characteristic localization of surface acid phosphatase in asexually; sexually growing of *Tremella mesenterica*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 79-83, 1983.
- HERMAN, E. M.; BAUMGARTNER, B.; CHRISPEELS, M. Uptake; apparent digestion of cytoplasmic organelles by protein bodies (protein storage vacuoles) in mug bean cotyledons. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 24, p. 226-235, 1981.
- HIRSCH, H. H.; SCHIFFER, H. H.; WOLF, D. Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). **Eur J Biochem.**, v. 207, p. 867-876, 1992.
- HISLOP, E. C.; BARNABY, V. M.; SHELLIS, C.; LABORDA, F. Localization of α -L-arabinofuranosidase and acid phosphatase in mycelium of *Sclerotinia fructigena*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 81, p. 19-99, 1974.
- HOCH, H. C.; STAPLES, R. C. Ultrastructural organization of the non-differentiated uredospore germling of *Uromyces phaseoli* varietety *typica*. **Mycologia**, v. 75, p. 795-824, 1983.
- HOCH, H. C.; STAPLES, R. C. Structural; chemical changes among the rust fungi during appressorium development. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 25, p. 231-24., 1987.
- HOLEN. I.; GORDON, P. B.; STROMHAUG, E.; BERG, T.; FEGSRUD, M. BRECH, A.; ROOS, N.; BERG, T.; SEGLEN, P. Inhibition of asialoglycoprotein endocytosis and

- degradation in rat hepatocytes by protein phosphatase inhibitors. **Biochem. J.**, v. 311, p. 317-326, 1996.
- HOURI, J. J.; OGIER-DENIS, E.; STEFANIS, D.; BAUVY, C.; BACCINO, F. M.; ISIDORO, C. Differentiation-dependent autophagy controls the fate of newly synthesized N-linked glycoproteins in the colon adenocarcinoma HT-29 cell line. **Biochem. J.**, v. 309 p. 521-527, 1995.
- HOWARD, R. J.; FERRARI, M. Role of melanin in appressorium function. **Exp. Mycol.**, v. 13, p. 403-418, 1989.
- HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking; entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 491-512, 1996.
- HUANG, Y.; KAO, C. H. Senescence of rice leaves and changes of acid phosphatase activity. **Bot. Bull. Academia Sinica**, v. 32, p. 37-42, 1991.
- HUGUENIN, B.; LOURD, M.; GEIGER, J. P. Comparaison entre isolats de *Colletotrichum falcatum* et *Colletotrichum graminicola* sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et pathologiques. **Phytopathol. Z.**, v. 105, p. 293-304, 1982.
- INDGE, K. Polyphosphates of the yeast cell vacuole. **J. Gen. Microbiol.**, 51, p. 447-455, 1968.
- ITO, S.; HIRATA, Y. Isolation; structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, p. 2429-2430, 1977.
- JAN, L. E. Mechanism of cellular autophagy. In: DINGLE, J. T. & FELL, H.B. **Lysosomes in Biology and Pathology**, v. 2. North Holland Publishing Company-Amsterdam-Oxford; American Elsevier Publishing Company, Inc., New York. p. 345-394, 1969.

- JONES, C. L.; LONERGAN, G. T.; MAINWARING, D. E. Acid phosphatase positional correlations in solid surface fungal cultivation: a fractal interpretation of biochemical differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** , v. 208, p. 1159-1165, 1995.
- JORDAN, C. M.; DEVAY, J. E. Lysosome disruption associated with hypersensitive reaction in the potato-*Phytophthora infestans* host-parasite interaction. **Physiol. Molecul. Planta Pathol.**, v. 36, p. 221-136, 1990.
- KASHO, V. N.; BAYKOV, A. A.; AVAAEVA, S. M. Comparative effect of fluoride on three pyrophosphate-hydrolyzing acid and alkaline phosphatase and inorganic pyrophosphatase. **Biokhimiya**, v. 47, p. 1289-1292, 1982.
- KERRIGAN, J.; MIMS, C. W. Ultrastructural cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. **The BEAM Newsletter of the Southeastern Electron Microscopy Society.**, v. 9, p. 21-25, 1993.
- KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P.K.; EMR, S. D. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 266-292, 1990.
- KNECHT, D. A.; GREEN, E. D.; LOOMIS, W. F.; DIMOND, R. L. Development changes in the modification of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. **Develop. Biol.**, v. 107, p. 490-502, 1985.
- KROEHLER, C. J.; ANTIBUS, R. K.; LINKINS, A. E. The effects of inorganic phosphorus concentration on the acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. **Can. J. Bot.**, v. 66 p. 750-756, 1988.
- KUMMEROVÁ, M; BURESOVÁ, I. The effect of exogenous phosphate deficiency on the activity of acid phosphatase of the root of two maize genotypes. **Biologia Plant Plantaurum (PRAHA)**, v. 32, p. 1-7, 1990.
- LEACH, C. M. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. **Can. J. Bot.**, v. 43, p. 185-200, 1965.

- LEGER, R. S.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W.
Production *in vitro* of appressoria by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Exp. Mycol.**, v. 13, p. 274-288, 1989.
- LEITE, B. Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development. West Lafayette. **Tese de Doutorado**, Purdue University. 1992.
- LEITE, B.; NICHOLSON, R. L.. Mycosporine-alanine, a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Exp. Mycol.**, v. 16, p. 76-86, 1992.
- LEITE, B.; SCHADECK, R. J. G. Micosporinas: Papel no processo de germinação em esporos de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 149-155, 1996
- LEMOYNE, F.; BERNILLON, J.; FAVRE-BONVIN, J.; BOUILLANT, M. L.; ARPIN, N.
Occurrence and characteristics of amino alcohols and cyclohexanone components of fungal mycosporines. **Zeitschrift fur Naturforschung.**, v. 40, p. 612-616, 1985.
- LENK, S. E.; DUNN JR, W.; TRAUSCH, J. S.; CIECHANOVER, A.; SCHWARTZ, A. L.
Ubiquitin-activating enzyme, E1, is associated with maturation of autophagic vacuoles. **J. Cell Biol.**, v. 118, p. 301-308, 1992.
- LINDSAY, C. D.; J. L. HÁBROOK, J. L.; USPHALL. Examination of toxicity of *Clostridium perfringens* E-Toxin in MDCK cell line. **Toxic. In Vitro**, v. 9, p. 213-218, 1995.
- LINNEMANS, W. A. M.; BOER, P.; ELBERS, P. F. Localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: a clue to cell formation. **J. Bacteriol.**, v. 131, p. 638-644, 1977.

- LOWE, D. M.; SOVERCHIA, C.; MOORE, M. N. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. **Aquatic Toxicol.**, v. 33, p. 105-106, 1995.
- MAIA, L. C.; KIMBROUGH, J. W.; BENNY, G. L. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycologia**, v. 86, p. 343-349, 1994.
- MANDELS, G. R. Compartmentation of metabolic systems in the regulation of dormancy in fungus spores. **Exp. Mycol.**, v. 5, p. 278-291, 1981.
- MANN, T. Studies on the metabolism of mould fungi. **Exp. Mycol.**, v. 38, p. 339-345, 1944.
- MATILE, P. H. Plant lysosomes. In: Dingle, J. T.; Fell, H. B. **Lysosomes in Biology; Pathology**. North Holland Publishing Company-Amsterdam-Oxford; American Elsevier Publishing Company, Inc., New York. 2, p. 406-428. 1969.
- MAXWELL, D. P.; ARMENTROUT, V. N.; GRAVES JR., L. B. Microbodies in plant pathogenic fungi. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 15, p. 119-134, 1977.
- McRAE, C. F.; STEVENS, G. R. Role of conidial matrix of *Colletotrichum orbiculare* in pathogenesis of *Xanthium spinosum*. **Mycol. Res.**, v. 94, p. 890-89, 1990.
- MENDGEN, K.; DEISING, H. Transley Review No. 48. Infection structures on fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytol.**, v. 124, p. 193-213, 1993.
- MENDGEN K.; HAHN M.; DEISING H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 34, p. 367-386, 1996.
- MERCURE, E. W.; KUNOH, H. I.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. **Physiol. Molec. Plant Pathol.**, London, v. 45, p. 407-420, 1994.

- MILLS, G. L.; CANTINO, E. C. Isolation and characterization of microbodies; symphyomicrobodies with different buoyant densities from the fungus *Blastocladiella emersonii*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 67, p. 1256-1263, 1975.
- MIMS, C. W. An ultrastructural study of spore germination in the myxomycete *Arcyria cinerea*. **Mycologia**, v. 63, p. 586-601, 1971.
- MIMS, C. W. Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, v. 83, p. 1-19. 1991.
- MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of appressorium development by basidiospore germlings of the rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. **Protoplasma**, v. 148, p. 111-119, 1989.
- MIMS, C. W.; TAYLOR, J.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of the early stages of infection of peanut leaves by the rust fungus *Puccinia arachidis*. **Can. J. Bot.**, v. 67, p. 3570-3579, 1989.
- MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 156, p. 9-18, 1995.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. Prentice-Hall, Inc. Simon & Schuster/ A Viacon Company, New Jersey, p. 361, 1996.
- MOORE, B. R.; STUART, D. G.; FREE, S. J. Changes in the post-translational modification of lysosomal enzymes during development of *Dictyostelium*. **Differentiation**, v. 29, p. 7-13, 1985.
- MORAN, A.; BURGUILLO, F. J.; LÓPEZ, M. C.; DOMINGUEZ, A. Kinetic properties of derepressible acid phosphatase from the yeast form of *Yarrowia lipolytica*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 990, p. 288-296, 1989.

- MORIYASU, Y.; OSHUMI, Y. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 1233-124, 1996.
- NAGAYAMA, K.; KUMAR, A.; WEÜRTRICH, K.; ERNST, R. R. J. Sensitive enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy. **Magn. Reson.**, v. 67, p. 565-569, 1980.
- NAHAS, E. Control and localization of phosphatases in conidia of *Neurospora crassa*. **Can. J. Microbiol.**, v. 35, p. 830-835, 1989.
- NAHAS, E.; TERENCE, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production: secretion of acid phosphatase (EC 3. 1. 3. 2.); alkaline phosphatase (EC 3. 1. 3.) in *Neurospora crassa*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 128, p. 2017-2021, 1982.
- NAKA, W.; FUKUDA, T.; OHMI, T.; KANAI, K.; NISIKAWA, T. Ultrastructure of *Trichophyton mentagrophytes* stained with neutral red. **J. Med. Veter. Mycol.**, v. 33, p. 141-143, 1995.
- NAKAMURA, N.; MATSUURA, A.; WADA, Y.; OSHUMI, Y. Acidification of vacuoles is required for autophagy degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biochem.**, v. 121, p. 338-344, 1997.
- NICHOLSON, R. L. *Colletotrichum graminicola*; the anthracnose diseases of maize and sorghum. In: Bailey, J. A & Jeger, M.J. eds. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. British Society for Plant Pathology. CAB International, p. 186-20, 1992.
- NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface, prerequisite for pathogenesis. In: Cole, G.T & Hoch, H. C. eds. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York. Plenum Press. p. 3-23, 1991.
- NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, p. 255-261, 1980.

- NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L.G.; ASQUITH, T. N. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 76, 1315-1318, 1986.
- NICHOLSON, R. L.; HIPSKIND, J.; HANAU, R. M. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 35, p. 243-252, 1989.
- NISHIZAWA, N.; MORI, S. Vacuole formation as a result of intracellular digestion: acid phosphatase localization as associated with plasmalema-invagination and vacuole formation. **Soil Sci. Nutr.**, v. 26, p. 525-54, 1980.
- NOVIKOFF, A. B. The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (A review). 1976. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 73, p. 2781-1986.
- NOZAWA, S. R.; MACCHERONI, W.; STABLEI, R. G. Purification and properties of Pi-repressible acid phosphatase from *Aspergillus nidulans*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1517-1532, 1998.
- O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 27, p. 75-98, 1985.
- PANARA, E.; PASQUALINI, S.; ANTONIELLI. Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1037, p. 73-80, 1990.
- PASCHOLATI, S. F. *Fitopatógenos: arsenal enzimático*. In: **Manual de Fitopatologia**. Filho, B.; Kimati, H.; Amorim, L. Editora Agronômica Ceres, LTDA. São Paulo, SP. p. 344-392, 1995.

- PASCHOLATI, S. F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R. L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 42, p. 37-51, 1993.
- PASQUALINI, S.; PANARA, E.; ANTONIELLE, M. Acid phosphatase in *Pinus pinea*-*Tuber albidum* ectomyrrhizal association. **Can. J. Bot.**, v. 70, p. 1377-1383, 1992.
- PERIASAMY, K.; RAMAN, N. Effects of Cu; Ni on acid phosphatase activity of an actomyorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 33, p. 537-538, 1995.
- PITEL, J. A.; CHELIAK, W. M. Enzyme activity during imbibition; germination of seeds of tamarack (*Larix laricina*). **Physiol. Plant.**, v. 67, p. 562-569, 1986.
- PITTET, J. L.; BOURGUIGNON, B.; ARPIN, N. Sporulation et mycosporines chez un champignon imparfait: *Aschochyta fabae*. **Physiol. Plant**, v. 57. P. 565-572, 1983c.
- PITTET, J. L.; LÉTOUBLON, R.; FROT-COUTAZ, J.; ARPIN, N. Soluble uridine diphospho-D-glucose: mycosporin glucosyltransferase from spores of *Aschochyta fabae* Speg. **Planta**, v. 159, p. 159-164, 1983b.
- PITTET, J. L.; BOUILLANT, M. L.; BERNILLON, J.; ARPIN, N.; FAVRE-BONVIN, J. Sur la presence de mycosporines-glutamine reduites, nouvelles molécules, chez plusieurs Deuteromycetes. **Tetrahedron Lett.**, v. 24, p. 65-68, 1983a.
- POLITIS, D. J. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 8, p. 117-122, 1976.
- POLITIS, D. J.; WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 3, p. 465-471, 1973.
- RAM, S. P.; SULLIVAN, P. A.; SHEPERD, M. G. The "in situ" assay of *Candida albicans* enzymes during yeast growth and germ-tube formation. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 2367-2378, 1983.

- RATHS, S.; ROHRER, J.; CRAUSAZ, F.; RIEZMAN, H. *end-3* and *end-4*: Two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 120, p. 55-65, 1993.
- REPETTO, G.; SANZ, P.; REPETTO, M. Effects of cobalt on mouse neuroblastoma cells culture "in vitro". **Toxic. in Vitro**, v. 9, p. 375-579, 1995
- RIJN, H. J. M.; LINNEMANS, W. A. N.; BOER, P. Localization of acid phosphatase in protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 123, p. 1144-1149, 1975.
- ROSING, W. C. Ultracytochemical localization of acid phosphatase within deliquescing asci of *Chaetomium brasiliense*. **Mycologia**, v. 76, p. 67-73, 1984.
- ROSSI, A.; PALMA, M. S.; LEONE, F.; BRIGLIADOR, M. A. Properties of acid phosphatase from scutella of germination maize seed. **Phytochemistry**, v. 2, p. 1823-1826, 1981.
- RUBEN, D. M.; STAGHELLINI, E. Ultrastructure of oospore germination in *Pythium aphanidermatum*. **Am. J. Bot.**, v. 65, p. 491-501, 1978.
- RUCH, D. G.; BURTON, K.W.; INGRAM, L. An occurrence of the glyoxylate cycle in basidiospores of homobasidiomycetes. **Mycologia**, v. 83, p. 821-825, 1991.
- RUCH, D. G.; MOTTA, J. J. Ultrastructure and cytochemistry of dormant basidiospores of *Psilocybe cubensis* **Mycologia**, v. 79, p. 387-398, 1987.
- RUCH, D. G.; NORTH, M. C. Ultrastructure of dormant basidiospores of *Agaricus campestris*. **Can. J. Bot.**, v. 66, 583-587, 1988.
- SAITO, M. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytol.**, v. 129, p. 425-431, 1995.
- SALAKO, E. A. The ultrastructure of uredospore of *Puccinia recondita*. **Mycopathologia**, v. 76, p. 3-12, 1981.

- SANGWAN, R. S.; MATHIVET, V.; VASSEUR, G. Ultrastructural localization of acid phosphatase during male meiosis and sporogenesis in *Datura*: evidence for digestion of cytoplasmic structures in the vacuoles. **Protoplasma**, v. 149, p. 36-46, 1989.
- SATO, M.; OHTA, Y. Increase of intracellular vacuole enzyme activities during autolysis of *Sacharomyces cerevisiae*. **Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.**, v. 37, p. 11-15, 1985.
- SCHÖNHOLZER, F.; SCHWEINGRUBER, A. M.; TRACHSEL, H.; SCHWEINGRUBER, E. Intracellular maturation and secretion of acid phosphatase of *Saccaromyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 147, p. 273-279, 1985.
- SEGLEN, P. Inhibitors of lysosomal function. **Methods Enzymol.**, v. 96, p. 737-765, 1983.
- SEKHAR, K. N. C.; DEMASON, D. A. Differential activity of acid phosphatase from the endogenous: haustorium of data palm (*Phoenix dactylifera*) seeds. **Can. J. Bot.**, v. 67, p. 1096-1102, 1989.
- SHIMARA, K.; YAZAKI, Y.; SAKANO, K. WADA, Y.; OHSUMI, Y. Vacuolar function in the phosphate homeostasis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Plant Cell Physiol.**, v. 37, p. 1090-1093, 1996.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara Koogan, S.A. Rio de Janeiro. p. 87-119, 1994.
- SMITH, J.E.; BERRY, D. R. **An Introduction to Biochemistry of Fungal Development**. London, Academic Press. 1974.
- SPROSTON, T.; SETLOW, B. Ergosterol and substitutes for the ultraviolet radiation requirement for conidia formation in *Stemphylium solani*. **Mycologia**, v. 60, p. 104-114, 1968.
- STOCKES, D. L.; HESS, W. M. Ultrastructure of dormant and germinated basidiospores of a species of *Psilocybe*. **Mycologia**, v. 62, p. 176-191, 1970.

- STRAKER, C. J.; MITCHELL, D. T. The activity and characterization of acid phosphatase in endomycorrhizal fungi of the ericaceae. **New Phytol.**, v. 104, p. 243-256, 1986.
- SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Partial characterization of the extracellular matrix release onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germlings of *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 52, p. 411-425, 1998.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A. and Jeger, M. J. eds. ***Colletotrichum: biology, pathology: control***. British Society for Plant Pathology. CAB International. p. 88-120, 1992,
- SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; ISHIDA, N.; YAMAMOTO, M. Chemical dissolution of cellulose membranes as a prerequisite for penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 128, p. 1035-1039, 1982.
- SVEDSEN, C.; WEEKS, J. M. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). **Mar. Poll. Bullet.**, v. 31, p. 139-142, 1995.
- SZABO-NAGY, A.; OLAH, Z.; ERDEI, L. Phosphatase induction in roots of winter wheat during adaptation to phosphorus deficiency. **Physiol. Plantarum**, v. 70, p. 544-552, 1987.
- TAKESHIGE, K.; BABA, M.; TSUBOI, S.; NODA, T.; OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 301-311, 1992.
- TAN, K. K.; EPTON, H. A. Ultraviolet-absorbing compounds associates with sporulation in *Botrytis cinerea*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 63, p. 157-167, 1974.
- TARAFAR, J. C.; RAO, A. V.; PRAVEEN-KUMAR. Role of phosphatase-producing fungi on the growth and nutrition of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). **J. Arid Environment**, v. 29, p. 331-337, 1995.

- TENO, A. M.; ROSSI, A. Acid phosphatase from maize scutellum: properties as a function on seed germination. **Phytochemistry**, v. 26, p.55-58, 1987.
- THAKUR, M. S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. J. Microscopic observations of Sudan Black B staining to monitor production of microbodies. **Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 42, p. 129-134, 1988.
- THUMM, M.; EGNER, R.; KOCH, R.; SCHULUMBERGER, B.; STRAUB, M.; VEENHIUS, M.; WOLF, D. H. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 349, p. 275-280, 1994.
- TOLBERT, N. E.; ESSNER, E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. **J. Cell. Biol.**, v. 91, p. 271s-283s, 1981.
- TONINO, C. J. M.; STEYN-PARVÉ, E. Localization of some phosphatase in yeast. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 67, p. 453-469, 1963.
- TRIMBLE, R. B.; MALEY, F.; WATOREK, W. Subunit structure; carbohydrate composition of the extracellular acid phosphatase of *Rhodotorula glutinis*. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 10037-10043, 1981.
- TRIONE, E. J.; LEACH, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, v. 59, p. 1077-1083, 1969.
- TRIONE, E. J.; LEACH, C. M.; MUTCH, J. T. Sporogenic substances isolated from fungi. **Nature**, v. 212, p. 163-164, 1966.
- TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J. P.; ROBERT, D. M. Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 50, p. 285-290, 1989.
- TSUJINO, I.; YABE, K.; SEKIKAWA, I.; HAMANAKA, N. Isolation and structure of a mycosporine from the red alga *Chondrus yendoi*. **Tetrahedron Lett.**, 16, p. 1401-1402, 1978.

- TUTTLE, D. L.; DUNN JR., W. A. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 25-35, 1995.
- UESONO, Y.; TOKAI, M.; TANAKE, K.; TOH-E, A. Negative regulators of the PHO system of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of *PHO80*; *PHO85*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231 p. 426-432, 1992.
- VAN DYKE, C. G.; MIMS, C. W. Ultrastructure of conidia, conidium germination and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 2455-2467, 1991.
- VASILEVA-TONKOVA, E. S.; GALABOVA, D. N.; BALASHEVA, A. Purification; partial characterization of acid phosphatase from *Candida lipolytica*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 39, p. 479-483, 1993.
- VERSAW, W. K.; METZENBERG, R. L. Repressible cation-phosphate symports in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 3884-3887, 1995.
- VOLLAND, C.; URBAN-GRIMALD, D.; GÉRARD, G.; HAGUENAUER-TSAPIS, R. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 13, p. 9838-9841, 1994.
- WEETE, J. D. **Fungal lipid biochemistry**, New York, Plenum Press. 1974.
- WEETE, J. D. Spore lipid surface wax composition; metabolism during germination In: **Infection process of fungi**. Editors: Roberts, D. W. and Aist, J. R. A Bellagio Conference, March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. 1984.
- WENDLAND, B.; EMR, S. D. Pan1p, Yeast *aps15*, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. **J. Cell. Biol.**, v. 141, p. 71-84, 1998.
- WILSON, C. L.; JUNPER, G.; MASON, D. L. Vacuole dynamics in fungal pathogens. **Phytopathology**, v. 70, p. 783-788, 1980.

- YAMAMOTO, A.; MAEDA, Y.; TAKEUCHI, I. Development of an autophagic system in differentiating cells of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. **Protoplasma**, v. 108, p. 55-69, 1981.
- YOUNG, H.; PATTERSON, J. V. A. UV protective compound from *Glomerella cingulata* - a mycosporine. **Phytochemistry**, v. 21, p. 1075-1077, 1982.
- YUAN, W.; TUTTLE, D. L.; SHI, Y-J.; RALPH, G. S.; DUNN JR., A. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the α -subunit of phosphofrutokinase. **J. Cell. Biol.**, v. 110, p. 1935-1945, 1997.
- ZYTA, K. The role of acid phosphatase activity during enzymic dephosphorylation of phytate by *Aspergillus niger* phytase. **World J. Microbiol. Biotech.**, v. 9, p. 117-119, 1993.

9 ANEXOS - PUBLICAÇÕES

Anexos

Lipid Mobilization and Acid Phosphatase Activity in Lytic Compartments during Conidium Dormancy and Appressorium Formation of *Colletotrichum graminicola*

Ruth Janice Guse Schadeck*, Breno Leite^{**†}, and Dorly de Freitas Buchi*

*Department of Cellular Biology, Federal University of Paraná, C.P. 19031, 81531-970, Curitiba, PR, Brazil and **Department of Biochemistry, Federal University of Paraná, C.P. 19046, 81531-970, Curitiba, PR, Brazil

Key words: acid phosphatase/vacuoles/lipid/fungi/germination

ABSTRACT. *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of sorghum and corn, was investigated prior and during germination as to certain aspects of acid phosphatase activity and lipid mobilization. Ungerminated conidia cytoplasm was filled with lipid deposits, which were mobilized during the germination process. Cytochemical ultrastructural examination showed that conidia vacuoles exhibit acid phosphatase activity, which is suggestive of lytic activity. Lipid bodies, stored in the ungerminated conidia cytoplasm, were internalized by vacuoles in a process analogous to microautophagy and were apparently digested inside them. The lipid bodies disappeared and vacuoles became enlarged in conidial cells during germination. Appressoria also showed acid phosphatase activity in multiple heterogeneous vesicles which were, in most cases, juxtaposed with lipid bodies. These results suggest that the vacuolar system plays an important role during *C. graminicola* germination and that the initial stages of lipid metabolization are taking place inside the vacuoles.

The conidium of *Colletotrichum graminicola* is the causal agent of anthracnose of cereals and grasses. It is embedded in a mucilage (26) which exhibits high concentrations of the secondary metabolite mycosporine-alanine, responsible for self-inhibition of conidia germination (17). In *C. graminicola* conidia, the main endogenous nutritional reserve is constituted of lipid bodies, which fill most of the young conidia cytoplasm (23). Previous studies demonstrated that the lipid content decreases during aging with concomitant cytoplasmic vacuolation (16, 23). Large lipid globules were also shown in the appressoria of *C. graminicola* germinated on maize and oat leaves (29, 30). Lipid bodies digestion inside of the fungal vacuoles was suggested (39). Fungal and yeast vacuoles were often regarded as cellular structures analogous to lysosomes (2, 11, 13, 31). Although macromolecule degradation is an important function of these organelles, vacuoles are also involved in a variety of other cellular activities, for example, in compartmentalization of metabolites and cytosolic ion and pH homeostasis (15). Yeast vacuoles, the most studied, exhibit several hydrolytic enzymes such as proteinases, aminopeptidase I and α -mannosidase (15).

Acid phosphatase is a vacuolar hydrolase of several fungi (2, 13, 32). This enzyme generates orthophosphate as a result of hydrolysis of the organic phosphate (8) and, in different organisms, has been used as a marker for lysosomal structures (9, 33). Vacuolation of the appressoria was observed during fungal germination (22, 28), including that of *C. graminicola* germinated on maize leaves (30). In the present investigation we demonstrate the acid phosphatase activity in the vacuolar system of ungerminated conidia, germinated conidia and appressoria, and we also describe the mechanism of lipid bodies uptake by ungerminated conidia vacuoles.

MATERIALS AND METHODS

Growth of the fungus

Colletotrichum graminicola (teleomorph = *Glomerella graminicola*-Politis) (Ces.) Wils., isolate CgM2 was provided by Dr. R.L. Nicholson (Host Parasite Interaction Laboratory, Purdue University, West Lafayette, IN., USA). Conidia were grown at 22°C under constant fluorescent light on an oat-meal agar medium.

Cell preparation

Conidia were harvested from 14-day-old cultures, at maximum germination capacity (17) and washed in distilled water. Cellophane membranes were previously placed on the bot-

Corresponding author current address: Dr. Breno Leite, Departamento de Fitopatologia (NAP/MEPA)-ESALQ/USP, Caixa Postal, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil.

E-mail: bleite@carpa.ciagri.usp.br

tom of a 50 ml beaker to receive conidia for germination. Subsequently, 10 ml of a conidial suspension (10^3 conidia/ml) were applied over these membranes. Similarly, glass slides were placed on the bottom of a 200 ml beaker and 40 ml of a conidial suspension, at the same concentration, were applied over them. In both cases, the conidial suspension height over germination surfaces were performed at 1 cm. Cells were then incubated at 22°C for 16 h under constant fluorescent light.

Light microscopy of whole cells

Cells were stained with Sudan III for lipid detection and with fast green for background contrast. Ungerminated and germinated conidia adhering to glass slides were fixed in 4% formaldehyde for 25 min. Thereafter, conidia were washed with distilled water followed by a hydroalcoholic solution containing 60% isopropyl alcohol and then stained for lipids with Sudan III for 15 min. The hydroalcoholic stain solution consisted of a 60% saturated solution of Sudan III in isopropyl alcohol (6). Subsequently, cells were washed with distilled water, stained for 15 min in a solution containing 0.004% fast green and 0.04% acetic acid, washed with distilled water and mounted in glycerine. Staining with fast green was omitted in control cells. The preparations were photographed in Zeiss Axiophot photomicroscope.

Acid phosphatase activity

Ungerminated conidia and cellophane membranes with germinated conidia and appressoria were fixed with 1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 containing 5% sucrose, for 30 min. The cells were then washed twice in the same buffer, and subsequently twice in 0.1 M Tris maleate buffer pH 5.5 containing 5% sucrose, followed by incubation in the same buffer containing 2 mM sodium glycerophosphate (substrate) and 2 mM cerium chloride (phosphate acceptor) for 60 min. After incubation, cells were washed once in the same buffer and once in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 containing 5% sucrose and then processed for transmission electron microscopy (21). Cerium phosphate reaction product deposition was used as the parameter for localization of acid phosphatase activity. Control cells were incubated without substrate.

Transmission electron microscopy (TEM)

Ungerminated conidia and cellophane membranes with germinated conidia and appressoria were fixed for 2 h in a solution containing 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 5 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2. Cells were then washed in the same buffer and postfixed in a solution containing 1% OsO_4 , 0.8% ferrocyanide and 5 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2, dehydrated in a graded series of acetone (15 min each) and embedded in Spurr resin (3). Sections of cytochemical tests were observed without further contrast. The control for lipid bodies was performed by extraction during slow dehydration (30 min each) in the same graded series of acetone, and the sections stained with uranyl

acetate and lead citrate.

RESULTS

Lipid reserves in ungerminated and germinated conidia

Ungerminated conidia cytoplasm was filled with lipid reserves, which can be observed directly by Sudan III staining (Figs. 1–2). In the whole cells, it was possible to observe individualized fine lipid globules in the cellular periphery (Fig. 1). The presence of lipids in ungerminated conidia was confirmed by ultrastructural studies. The content of lipid bodies in the ungerminated conidia was extracted after slow dehydration in acetone, resulting in electron transparent regions (Fig. 7). These lipid bodies were observed as electron dense bodies at standard dehydration (Figs. 8–13). In appressoria, lipid bodies were observed by light (Fig. 4) and electron microscopy (Figs. 15–16).

Lipid mobilization and vacuolation in the conidia during germination

The light microscopic observations of the whole cells stained with Sudan III (Figs. 1–6) made possible a study of different stages of germination and its relation with the lipid content inside the conidia. Decrease in lipid deposits and vacuolation in the conidia was observed during germination (Figs. 2–6). The vacuolation of germinated conidia was also verified by electron microscopy, showing that the vacuoles can occupy most of the conidia cytoplasm (Fig. 14). Concomitantly with the lipid decrease, the presence of lipid material inside vacuoles of the conidia became evident during germ tube (Fig. 3) or appressoria (Fig. 5) formation. In later stages of appressorium formation, lipid bodies disappeared in the germinated conidia (Fig. 6). A septum dividing germinated conidia in two parts was verified by light (Fig. 6) and electron microscopy (Fig. 14), and numerous cells demonstrated lipid first decreasing in one half followed by the other half (Fig. 4).

Acid phosphatase activity in ungerminated conidia

The ungerminated conidium panoramic view (Fig. 8) revealed that the cytoplasmic volume contains a large number of lipid bodies, one nucleus and vacuoles, which display the acid phosphatase reaction product. Vacuoles exhibit cytoplasmic structures uptake and acid phosphatase reaction product associated with the internal face of the vacuolar membrane (Fig. 9). Initial and more advanced internalization stages of different cellular components were observed. Images strongly suggested membrane fusion and vesicle formation, which was introduced inside vacuoles, in the final stages of internalization. Details of the lipid body engulfment are described in figures 10–11. Initially, these bodies ad-

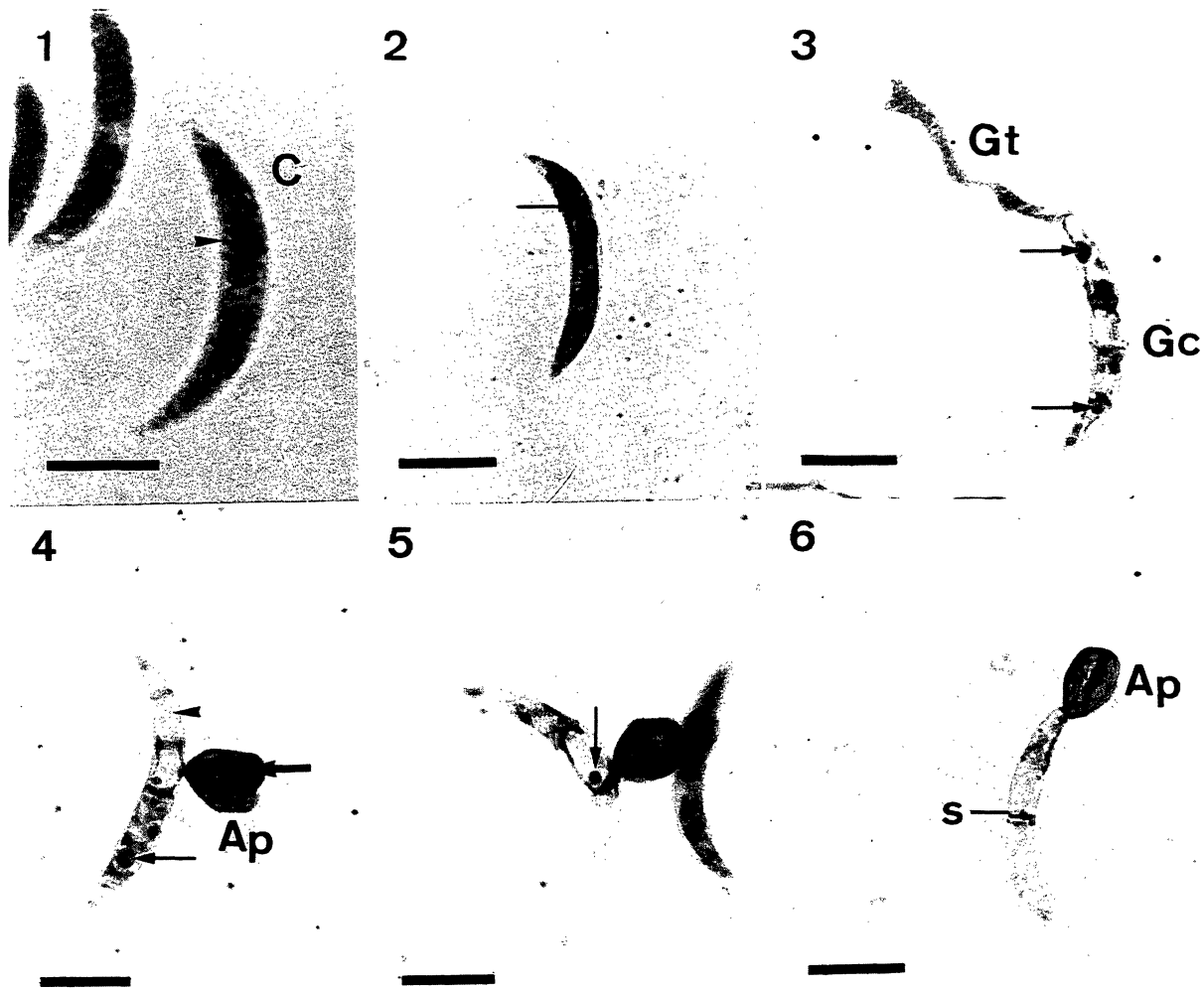


Fig. 1-6.

Fig. 1. Sudan III cytochemical reaction control in whole ungerminated conidium (C) exhibiting cytoplasm replete with lipid (red stained). Note fine lipid granulations in the cytoplasm periphery (arrow tip). Bar = 10 μ m.

Figs. 2-6. Lipid mobilization and vacuolation during germination, demonstrated by Sudan III cytochemical reaction post stained with fast green. Fig. 2. Ungerminated conidium showing cytoplasm completely occupied with lipids (arrow). Fig. 3. Germinated conidium (Gc) exhibiting lipid inside vacuoles (arrows) during germ tube (Gt) formation. Fig. 4. Germinated conidium exhibiting one half proximally empty (arrow tip) and other contained various lipid deposits (arrow). Lipid (thick arrow) can be observed inside the appressorium (Ap). Fig. 5. Germinated conidium exhibiting lipid material inside a vacuole (arrow). Note few lipid deposits in the conidium at this stage. Fig. 6. Germinated conidium exhibited only traces of lipids. Note, at this stage, total melanization of the appressorium (Ap) and the septum (s) that divides germinated conidium. Bars = 10 μ m.

here to the vacuolar membrane which begins to invaginate (Fig. 10). Then, the lipid material is surrounded by vacuolar membrane invaginations and protrusions (Fig. 11). Finally, a recently internalized vesicle containing lipid material was observed inside the vacuole (Fig. 11). Alterations in the engulfed material was verified and include the rupture of the internalized vesicle membrane and diversification of vesicles content (Fig. 12). Control cells, without the substrate, display a similar pattern of cytoplasmic material uptake (Fig. 13). In the

control cells, no deposition of reaction product was observed in any cellular structure at any of the monitored developmental stages.

Acid phosphatase activity and vacuolation in germinated conidia

Germinated conidia presents a large vacuole, that can occupy one half of the germinated conidia separated by a septum (Fig. 14). At this stage of development, the vacuoles also exhibit the reaction product in the lumen

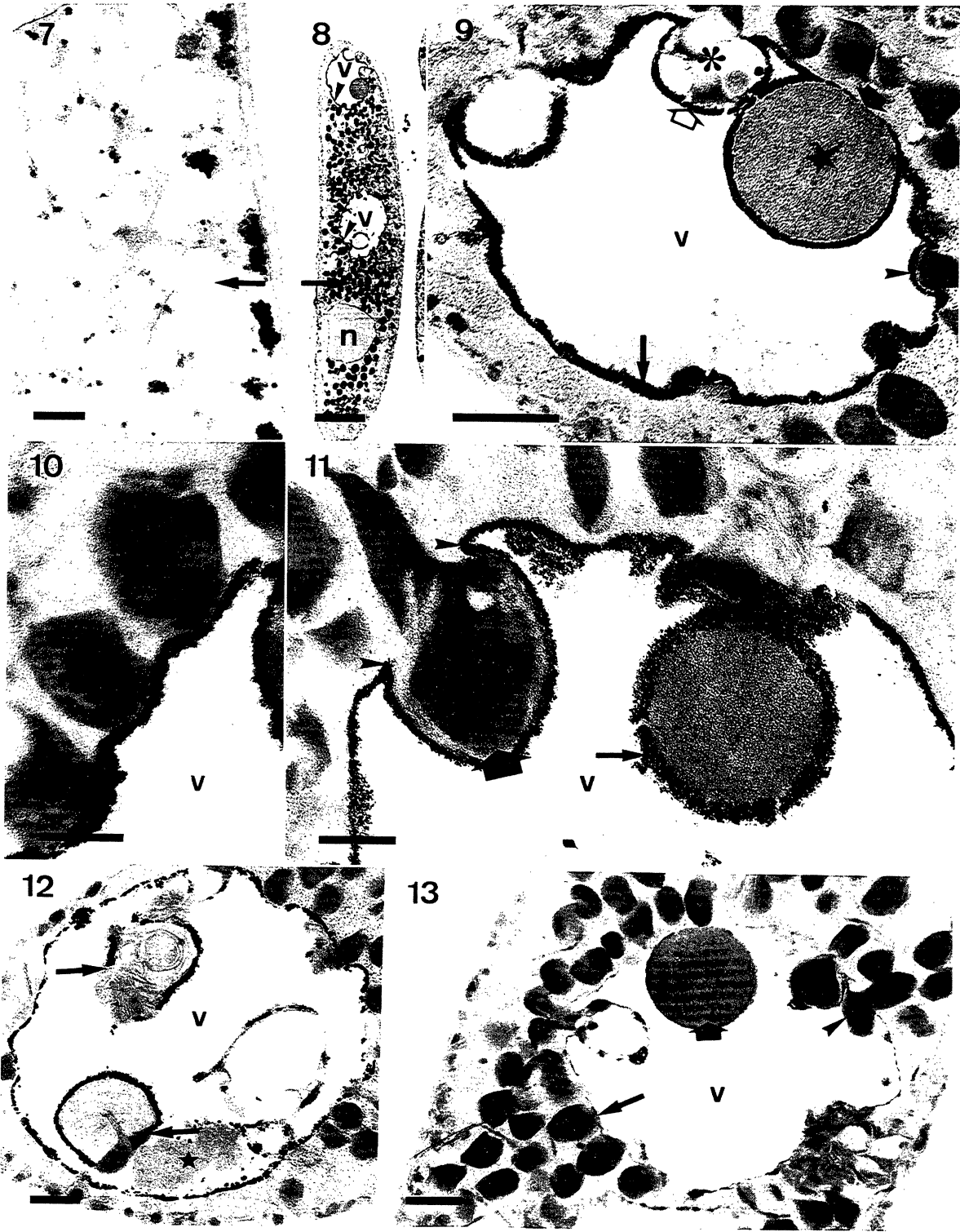


Fig. 7-13.

and no lipid bodies were observed in the conidia. Diversified vacuolar content, suggesting debris of cellular components, was observed in the lumen.

Acid phosphatase activity in appressoria

The reaction product was observed as dense deposits inside vesicles. These vesicles were heterogeneous in size and shape and were, in most cases, closely associated with lipid bodies (Figs. 15–16). Large lipid bodies occupy extensive cytoplasmic areas (Fig. 15) and lipid material was observed inside compartments containing the acid phosphatase reaction product (Fig. 16). The product of acid phosphatase was observed inside a vesicle that appeared to release its content, forming a continuous layer at the cellular surface (Fig. 17). The reaction product was also present in the extracellular matrix (Fig. 17). These results suggest secretion of acid phosphatase.

DISCUSSION

Lipid reserves are broadly found in fungal spores (38). The abundant lipid deposits observed in ungerminated conidia, by different techniques, have been previously demonstrated in *C. graminicola* by freeze-substitution procedures (23). These authors demonstrated that young conidia cytoplasm was dominated by lipid bodies. Other species of *Colletotrichum* exhibit a similar pattern of lipid deposits (14, 37). In the same way, the lipid globules observed in appressoria were similar to those demonstrated in the appressoria of *C. graminicola* germinated on the leaves of maize (30). A decreasing conidial lipid content, while the germinating process moves forward, is in agreement with studies which described lipid processing during the germination of different fungi (7, 19, 20). The vacuolation was observed during aging of *C. graminicola* conidia (16, 23). Previous observations demonstrated neutral red uptake by *C. graminicola* conidia (16). In this case, the

formed vesicles are apparently transferred to the vacuole interior. Our results demonstrated the presence of lipids inside conidia vacuoles by light microscopy, during different stages of germination, and by electron microscopy, in ungerminated conidia. Lipid engulfment by vacuoles, followed by digestion, was suggested to occur in *Botrytis cinerea* and *Ceratocystis ulmi*, as well as for glycogen in *Elsinöe wiconsinensis* (39). In a similar manner, Kerrigan and Mims (1993) suggested vacuolar lipid uptake in old conidial vacuoles of *Colletotrichum gloeosporioides*. In ungerminated conidia, the product deposition of the acid phosphatase reaction on the interior surface of the vacuolar membrane (Fig. 9) provided a useful marker for studying the uptake mechanism of cellular components. Our results suggest that the uptake mechanism of lipid bodies and other cellular structures by ungerminated vacuoles is analogous to microautophagy. In this process, cytoplasmic components are directly sequestered inside the vacuole or lysosome by invagination or protrusion of the vacuolar or lysosomal membrane (40). The changes observed in the internalized material are indicative of an ongoing digestive process and was used as parameters of vacuole digestion activity in fungal and plant cells (12, 39). Uptake of cytoplasmic structures by vacuoles, followed by digestion, are characteristics of an autophagic process. Recently, autophagy was demonstrated in many strains of yeast. In *Saccharomyces cerevisiae*, nutrient starvation induces nonselective autophagic degradation in the vacuoles (34). Tuttle and Dunn (1995) demonstrated that the degradation of peroxisomes in *Pichia pastoris* may be due to a process analogous to microautophagy or macroautophagy, depending on the medium conditions. In the mutant yeast *pep-4*, when glucose-starved cells were replenished with glucose, degradation of peroxisomes by microautophagy was observed (5).

Vacuoles play an important role in breakdown of macromolecular constituents of yeast and other fungal cells (15, 39). However, only a few publications are

Fig. 7. Control of lipids in the ungerminated conidium. Electron transparent remains of extracted lipid bodies (arrow) was observed. Bar = 1 μm .

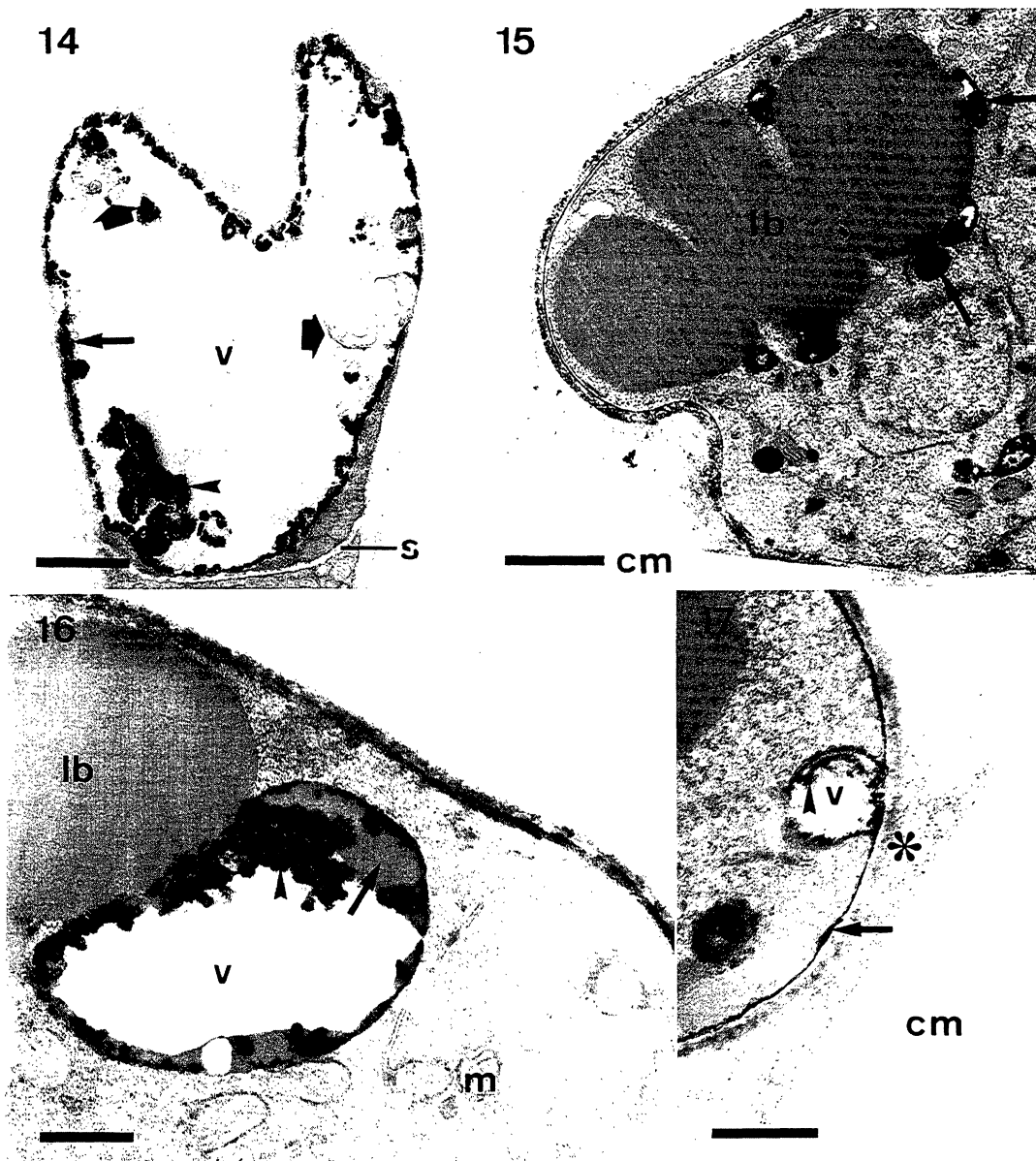
Fig. 8. Ungerminated conidium longitudinal section. The acid phosphatase reaction product (arrow tips) is observed inside vacuoles (v). Note numerous stored lipid bodies (arrow) in the cytoplasm. The nucleus (n) is observed. Bar = 2.5 μm .

Fig. 9. Higher magnification of an ungerminated conidium vacuole (v). Lipid bodies (lb) in the cytoplasm and deposition of acid phosphatase reaction product at the vacuolar membrane (arrow) are observed. Note the initial membrane invagination (arrow tip), during early stages of a lipid body uptake, and deepening (empty arrow), during a more advanced engulfment stage of diversified structures (asterisk). A vesicle (star), apparently in formation, seems to present a fused membrane region with the vacuole membrane (thick arrow). Bar = 500 nm.

Figs. 10–11. Lipid body uptake by ungerminated conidia vacuoles (v). **Fig. 10.** Lipid body (lb) adhesion to the external side (arrow) of the vacuole membrane. Note the initial membrane invagination in this area. Bar = 200 nm. **Fig. 11.** Advanced stages of lipid internalization. Deep invagination involving material to be engulfed (thick arrow) and membrane protrusions (arrow tips) are observed. A recently internalized vesicle (arrow) is shown. Bar = 200 nm.

Fig. 12. Internalized vesicle alterations in an ungerminated conidia vacuole (v). The internalized vesicle contains diversified material and shows ruptures in the membrane (arrows). Free material (star) in the vacuolar lumen is observable. Bar = 500 nm.

Fig. 13. Acid phosphatase control in ungerminated conidium with no reaction product in any cellular structure. Note the adhesion (arrow) of lipid bodies (lb) to the vacuole (v) membrane. Engulfing of cytoplasmic lipid bodies (arrow tip) and internalized material that presents equal electron density of lipid bodies (thick arrow) are verified. Bar = 500 nm.



Figs. 14–17. Acid phosphatase reaction product during germination. Fig. 14. Germinated conidium exhibiting a large vacuole (v). Acid phosphatase reaction product is associated with the vacuolar membrane (arrow) and present in the vacuolar lumen (arrow tip). A septum (s) dividing the conidium is observed. Note the diversified components that present membranous debris contained in the lumen (thick arrows). Bar = 2 μ m. Fig. 15. Appressorium exhibiting the reaction product in vesicles associated with lipid bodies (arrows). Note the very close juxtaposition between vesicles and lipids. Cellophane membrane (cm) is observed. Bar = 1 μ m. Fig. 16. Large appressorial vesicle (v) juxtaposed to the lipid bodies (lb). Acid phosphatase reaction product (arrow tip) and lipid material (arrow) are present in the lumen of the vesicle. Note the close contact between lipid material and vesicle. Mitochondria (m) are observed. Bar = 500 nm. Fig. 17. Acid phosphatase secretion in the appressorium. The acid phosphatase reaction product (arrow tip) inside the vesicle (v) is continuous with the cellular surface (arrow). Note the acid phosphatase reaction product present in the extracellular matrix (asterisk). Cellophane membrane (cm) is observed. Bar = 400 nm.

concerned with acid phosphatase activity during germination in fungi (25, 35). Our results demonstrate that, in *C. graminicola*, acid phosphatase activity is mainly localized in the vacuolar system in ungerminated and germinated conidia, and in the appressoria. The pre-

sence of acid phosphatase, together with morphological evidences, suggest a digestive function for these cellular structures. Acid phosphatase has been classically considered as the marker enzyme for lysosomes (27). Lysosomal function was attributed to microbial vacu-

oles, which exhibited the activity of this enzyme, in *Sclerotinia fructigena* (13), *Saccharomyces cerevisiae* (31), *Sclerotium rolfsii* (11) and *Aspergillus flavus* (2). Nevertheless, fungi vacuoles are also involved in a variety of physiological functions (15).

Vacuolation of germinated conidium and the presence of cellular debris inside the vacuoles suggest an autophagic process. An increase in autophagy is classically known to happen when the cells are exposed to different stresses, submitted to a great metabolic overload or extensive cellular remodeling (1, 4, 9, 34).

In the appressoria, the proximity between vesicles and lipid bodies and the presence of lipid material inside these vesicles (Figs. 15–16) indicate involvement of these compartments in lipid mobilization. However, vesicle-lipid interaction and lipid internalization mechanism are not clear. In the appressoria, the reaction product of acid phosphatase was not restricted to the vacuolar system, but was also present in secretory vesicles, and the cell surface and extracellular matrix (Fig. 17). Fungi and yeast secrete acid phosphatase (10, 24) and this enzyme is demonstrated in the cell wall and periplasmic space (2, 18, 35). The secreted enzyme may hydrolyze phosphate esters, resulting from degradation of organic compounds in nature (25). Specifically, during germination, acid phosphatase was secreted by *Neurospora crassa* (25) and in *Candida albicans* the activity of this enzyme may have disappeared from the conidial surface and be transferred to the germ tube cell wall (35). These authors suggested that the enzyme may be involved in phosphoprotein dephosphorylation during cell wall reorganization.

We presently use deposition of the acid phosphatase reaction product as a marker to study the vacuolar system in *C. graminicola* and to describe the intake of cellular components into the vacuoles. Our data indicate that ungerminated conidia vacuoles and appressoria vesicles are lytic compartments and demonstrate that the mechanism of the lipid body uptake in ungerminated conidia is analogous to microautophagy. Germination is characterized by hydrolysis of reserves from the storage tissue. Knowledge of the cellular processes involved in intracellular digestion can contribute to the understanding of mechanisms of germination regulation in fungi.

Acknowledgments. We thank Marco A. Randi for his technical advice on lipid staining. We thank Dr. Philip A.J. Gorin and Dr. Marshall Yates for their comments regarding the manuscript. This research was supported in part by grants from the Brazilian National Research Council CNPq, PRONEX and FUNPAR.

REFERENCES

1. BABA, M., TAKESHIGE, K., BABA, N., and OHSUMI, Y. 1994.

Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biology*, **124**: 903–913.

2. BOJOVIC-CVETIC, D. and VUNJIC, R. 1982. Acid phosphatase and distribution in *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **79**: 137–141.

3. BUCHI, D.F. and SOUZA, W. 1992. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **24**: 135–141.

4. BUCHER, F. and HOFER, R. 1993. Histological and enzyme histochemical changes in the kidney of male bullhead (*Cottus gobio*) during the spawning period. *Journal of Fish Biology*, **42**: 403–409.

5. CHIANG, H.L., SCHEKMAN, R., and HAMAMOTO, S. 1996. Selective uptake of cytosolic, peroxysomal and plasma membrane proteins into yeast lysosome for degradation. *J. Biol. Chem.*, **271**: 9934–9941.

6. CULLING, C.F.A. 1983. *Handbook of histopathological and histochemical techniques*. Third ed. Butterworth and Co. Ltd. London, United Kingdom. 361pp.

7. GASPAS, M.L., POLLERO, R.J., and CABELLO, M.N. 1994. Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *JAOCS*, **71**: 449–452.

8. GONZÁLEZ, F.J., FAUSTE, C., BURGUILLO, F.J., and DOMINGUEZ, A. 1993. Kinetic behavior of a repressible acid phosphatase from the yeast *Yarrowia lipolytica*: a comparative study between the solubilized enzyme, the enzyme bound to cell-wall fragments and the enzyme bound to intact cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1162**: 17–27.

9. GUNAWARDANA, V.K. 1992. Lysosomes in the seminiferous tubules of the domestic fowl as revealed by acid phosphatase activity. *Acta. Histochem. Cytochem.*, **25**: 91–96.

10. HAN, S.W., MICHELIN, M.A., BARBOSA, J.E., and ROSSI, A. 1994. Purification and constitutive excretion of acid phosphatase in *Neurospora crassa*. *Phytochemistry*, **35**: 1131–1135.

11. HÄNSSLER, G., MAXWEEL, D.P., and MAXWEEL, M.D. 1975. Demonstrations of acid phosphatase-containing vacuoles in hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. *J. Bacteriol.*, **124**: 997–1006.

12. HERMAN, E.M., BAUMGARTNER, B., and CHRISPEELS, M. 1981. Uptake and apparent digestion of cytoplasmic organelles by protein bodies (protein storage vacuoles) in mung bean cotyledons. *Eur. J. Cell Biol.*, **24**: 226–235.

13. HISLOP, E.C., BARNABY, V.M., SHELLIS, C., and LABORDA, F. 1974. Localization of α -L-arabinofuranosidase and acid phosphatase in mycelium of *Sclerotinia fructigena*. *J. Gen. Microbiol.*, **81**: 19–99.

14. KERRIGAN, J. and MIMS, C.W. 1993. Ultrastructural and cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. *The BEAM Newsletter of the Southeastern Electron Microscopy Society*, **9**: 21–25.

15. KLIONSKY, D.J., HERMAN, P.K., and EMR, S.D. 1990. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **54**: 266–292.

16. LEITE, B. 1992. Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development. West Lafayette. PhD thesis, Purdue University.

17. LEITE, B. and NICHOLSON, R.L. 1992. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp. Mycol.*, **16**: 76–86.

18. LINNEMANS, W.A.M., BOER, P., and ELBERS, P.F. 1977. Localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: a

- clue to cell formation. *J. Bacteriol.*, **131**: 638–644.
19. MAIA, L.C., KIMBROUGH, J.W., and BENNY, G.L. 1994. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). *Mycologia*, **86**: 343–349.
 20. MAXWELL, D.P., ARMENTROUT, V.N., and GRAVES, JR. L.B. 1977. Microbodies in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **15**: 119–134.
 21. MEIRELLES, M.N.L. and SOUZA, W. 1986. The fate of plasma membrane macrophage enzyme markers during endocytosis of *Trypanosoma cruzi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **18**: 99–107.
 22. MIMS, C.W., TAYLOR, J., and RICHARDSON, E.A. 1989. Ultrastructure of the early stages of infection of peanut leaves by the rust fungus *Puccinia arachidis*. *Can. J. Bot.*, **67**: 3570–3579.
 23. MIMS, C.W., RICHARDSON, E.A., CLAY, R., and NICHOLSON, R.L. 1995. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Int. J. Plant. Sci.*, **156**: 9–18.
 24. NAHAS, E., TERENCE, H.F., and ROSSI, A. 1982. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 2017–2021.
 25. NAHAS, E. 1989. Control and localization of phosphatases in conidia of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.*, **35**: 830–835.
 26. NICHOLSON, R.L., HIPSKIND, J., and HANAU, R.M. 1989. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **35**: 243–252.
 27. NOVIKOFF, A.B. 1976. The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (A review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2781–2787.
 28. O'CONNELL, R.J., BAILEY, A., and RICHMOND, V. 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant. Pathol.*, **27**: 75–98.
 29. POLITIS, D.J. 1976. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. *Physiol. Plant. Pathol.*, **8**: 117–122.
 30. POLITIS, D.J. and WHEELER, H. 1973. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Plant. Pathol.*, **3**: 465–471.
 31. RUIJN, H.J.M., LINNEMANS, W.A.N., and BOER, P. 1975. Localization of acid phosphatase in protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **123**: 1144–1149.
 32. RUCH, D.G. and MOTTA, J.J. 1987. Ultrastructure and cytochemistry of dormant basidiospores of *Psilocybe cubensis*. *Mycologia*, **79**: 387–398.
 33. SANGWAN, R.S., MATHIVET, V., and VASSEUR, G. 1989. Ultrastructural localization of acid phosphatase during male meiosis and sporogenesis in *Datura*: evidence for digestion of cytoplasmic structures in the vacuoles. *Protoplasma*, **149**: 36–46.
 34. TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., and OHSUMI, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.*, **119**: 301–311.
 35. TRONCHIN, G., BOUCHARA, J.P., and ROBERT, R. 1989. Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. *Eur. J. Cell Biol.*, **50**: 285–290.
 36. TUTTLE, D.L. and DUNN, JR. W.A. 1995. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.*, **108**: 25–35.
 37. VAN DYKE, C.G. and MIMS, C.W. 1991. Ultrastructure of conidia, conidium germination, and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. *Can. J. Bot.*, **69**: 2455–2467.
 38. WEETE, J.E. 1974. Fungal lipid biochemistry. New York, Plenum Press. 12pp.
 39. WILSON, C.L., JUNPER, G., and MASON, D.L. 1980. Vacuole dynamics in fungal pathogens. *Phytopathol.*, **70**: 783–788.
 40. YUAN, W., TUTTLE, D.L., SHI, Y.-J., RALPH, G.S., and DUNN, JR. A. 1997. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the α -subunit of phosphofructokinase. *J. Cell Biol.*, **110**: 1935–1945.

(Received for publication, May 25, 1998

and in revised form, September 17, 1998)

Ultrastructural aspects of *Colletotrichum graminicola* conidium germination, appressorium formation and penetration on cellophane membranes: focus on lipid reserves

R.J.G. SCHADECK, D.F. BUCHI* and B. LEITE^o

Department of Biochemistry, and *Department of Cellular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

SUMMARY - *Colletotrichum graminicola*, a plant pathogen, was investigated at cytochemical and ultrastructural levels during conidium germination. Cytochemical optical tests and electron microscopy observations showed that the cytoplasm of ungerminated conidia was filled with small lipid bodies which were mobilized during the germination process. Appressoria were able to penetrate the cellophane membranes and exhibited an abundant extracellular matrix, which extended from the cellular wall to the cellophane surface. The presence of large lipid bodies in close proximity to vesicles, mitochondria and microbodies was demonstrated in the appressorium cytoplasm. These observations suggest that the glyoxylate cycle may be involved in lipid processing. A reaction product mediated by acid phosphatase was detected inside germ tube vacuoles, implying a lytic function for these organelles. Altogether, these changes indicate an intense remodeling process, high metabolic activity and lipid processing for germination and appressorium formation.

KEY WORDS germination - lipids - fungi - ultrastructure

INTRODUCTION

The plant pathogen *Colletotrichum graminicola* is the causal agent of anthracnose of cereals and grasses (Politis and Wheeler, 1973; Politis, 1976). The conidia are embedded in mucilage (Nicholson and Moraes, 1980) which protects them from desiccation, phenol toxicity and prevents their premature germination (Nicholson *et al.*, 1986, 1989; Leite and Nicholson, 1992). Ultrastructural studies demonstrated that the cytoplasm of the ungerminated conidium is filled with small lipid bodies, which are processed in the course of conidial aging (Mims *et al.*, 1995). Lipid bodies were also observed inside appressoria of *C. graminicola*, germinated on maize and oat leaves (Politis and Wheeler, 1973; Politis, 1976).

Transmission electron microscopy (TEM) observations

of the germination process have been performed in a considerable number of fungi. Ultrastructural aspects of the germination process on leaves are difficult to study because of problems in finding, orienting and sectioning specimens (Mims, 1991). The use of artificial membranes helps to solve these problems (Mims and Richardson, 1989; Mims, 1991). Similar studies have been carried out on dialysis and cellophane membranes with *Colletotrichum truncatum* and *Magnapotha grisea*, respectively (Bourett and Howard, 1990; Van Dyke and Mims, 1991).

We gave special attention to lipid reserves prior to and after germination. The reason for monitoring them is because we want to address the question of whether the glyoxylate cycle (Leite and Schadeck, 1996) is activated during the germination process.

MATERIALS AND METHODS

Growth of the fungus

Colletotrichum graminicola (teleomorph = *Glomerella graminicola* - Politis) (Ces.) Wils., isolate CgM2, was kindly provided by Dr. R.L. Nicholson (Host Parasite Interaction Laboratory, Purdue University, West Lafayette, IN., USA). The isolate was grown on oatmeal agar at 22 °C under constant fluorescent light. Conidia

Mailing address: Prof. Breno Leite, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19046, 81531-970 Curitiba, PR, Brazil; e-mail: bleite@bio.ufpr.br

Present address: Departamento de Fitopatologia, ESALQ-Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 09, 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil.

were harvested from 14-day-old cultures and washed in distilled water. Glass slides and cellophane membranes were previously placed on the bottom of a 50 ml beaker to receive conidia for germination. Subsequently, 10 ml of a conidial suspension (10^7 conidia/ml) were applied over the substrates, which were then incubated at 22 °C for 16 h under constant fluorescent light.

Optical cytochemistry

Conidia adhering to glass slides were fixed with Baker's aqueous solution containing 4% formaldehyde and 2% CaCl_2 for 25 min, then stained with Sudan III for 15 min, washed with distilled water, and mounted in glycerine for optical microscopy observations (Culling, 1983).

Acid phosphatase activity

Germinated conidia on cellophane membranes were fixed in 1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 5% sucrose for 30 min and washed twice in the same buffer and twice in 0.1 M Tris maleate buffer pH 5.5 containing 5% sucrose. They were incubated in a 0.1 M Tris maleate buffer pH 5.5 containing 2 mM sodium glycerophosphate (substrate) and 2 mM cerium chloride (phosphate acceptor), for 60 min. After incubation, cells were washed once in the incubation buffer and once in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 containing 5% sucrose and processed for TEM (Meirelles and Souza, 1986). Cerium phosphate reaction product deposition was used as a parameter for phosphatase activity localization. Controls were incubated without substrate.

Transmission electron microscopy (TEM)

Ungerminated and germinated conidia, grown on cellophane membranes, were fixed for 2 h in a solution containing 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 5 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2. Thereafter, cells were washed in the same buffer and postfixed in 1% OsO_4 and 0.8% ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, supplemented with 5 mM CaCl_2 . Samples were then dehydrated in an ascending acetone series and infiltrated with Spurr resin. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate (Buchi and Souza, 1992).

RESULTS

Nutritional reserves in ungerminated and germinated conidia

Sudan III optical cytochemistry showed that the ungerminated conidia cytoplasm is filled with lipids and that these reserves are processed during germination (Figs. 1 to 4). When appressorium formation was complete, no lipids were observed in the nearly empty conidium. The mature appressorium became heavily melanized (Fig. 4). After slow dehydration in acetone, lipid bodies appeared like small empty spaces inside the ungerminated conidium (Figs. 5 and 6) and were organized in large deposits inside the appressorium (Figs. 7, 9 and 11). Ungerminated conidia also contained glycogen-like granules (Fig. 6).

The penetration process

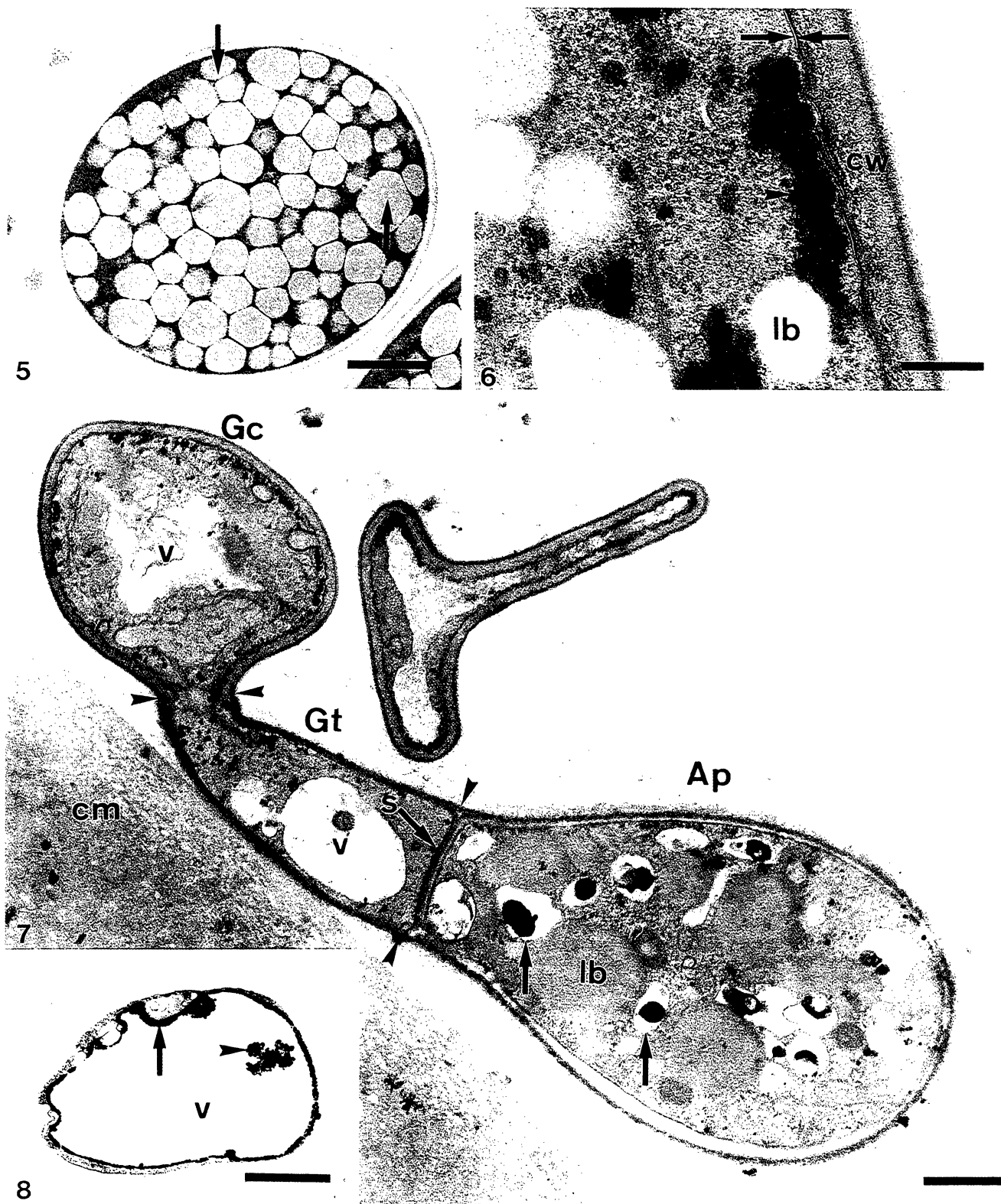
The appressorium wall disappeared at the pore region, allowing the plasma membrane to be juxtaposed to the cellophane surface (Fig. 9). Apparent secretion of an electron dense material inside the cellophane membrane was observed at the pore region (Fig. 10). Later stages showed the penetration peg within the cellophane (Fig. 14).

Characteristics of the germ tube and appressorium

Germ tubes exhibited vacuoles occupying large portions of the cytoplasm (Fig. 7) which contained the product of the acid phosphatase reaction (Fig. 8). Appressoria were separated from the germ tube by a septum (Fig. 8), and



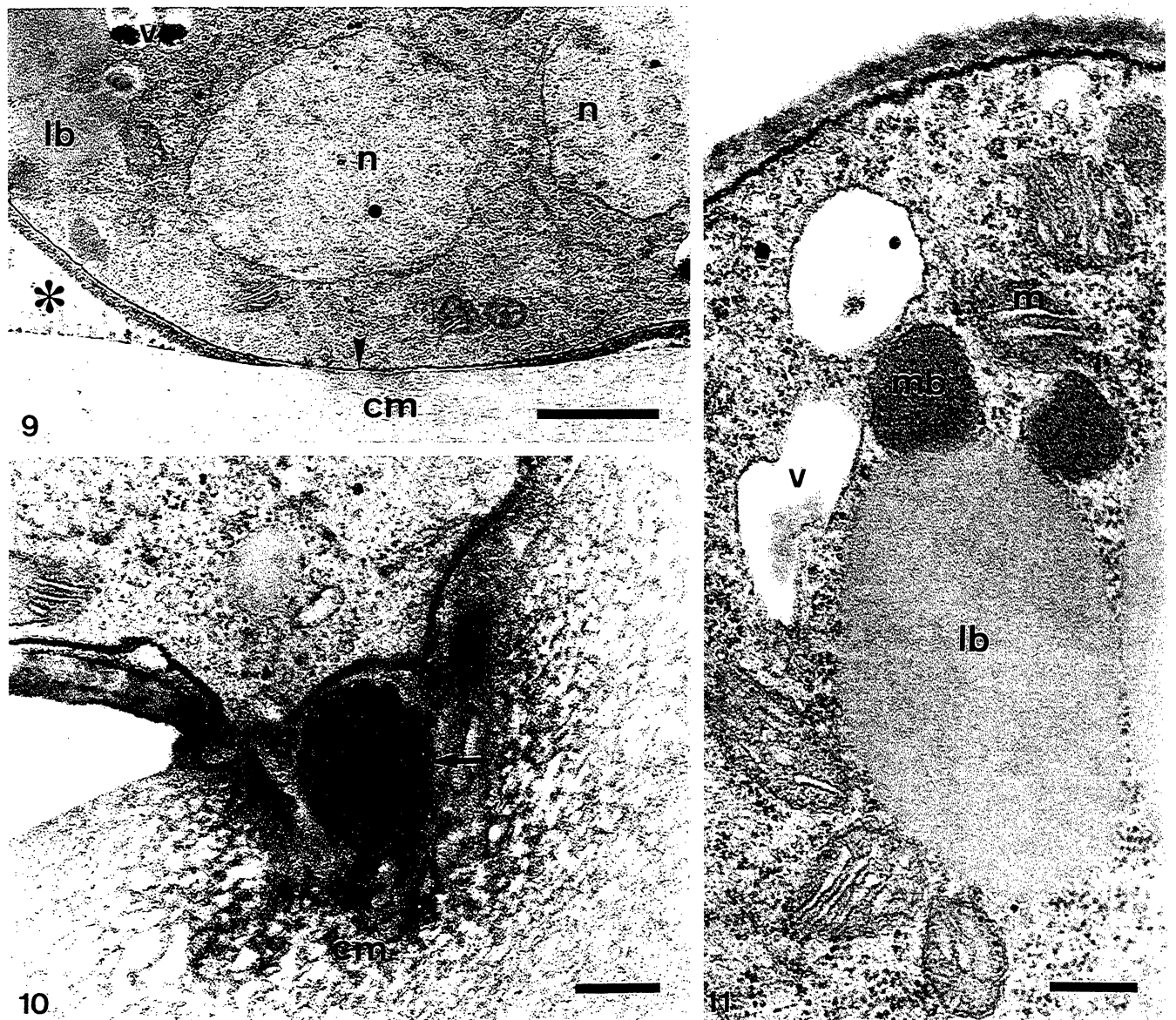
FIGURES 1 to 4 Light micrographs showing germlings of *C. graminicola* monitored by the Sudan III cytochemical reaction. (Fig. 1) Ungerminated conidium (C) exhibiting cytoplasm dominated by lipid reserves (arrowhead). (Fig. 2) Germinated conidium (Gc) showing lipids in the germ tube (Gt). (Fig. 3) Appressorium (Ap) containing lipid deposits as well. The septum (arrowhead) divides the conidium in two compartments. (Fig. 4) Lipid reserves (arrowhead) can be observed inside the appressorium (Ap). In contrast, lipids cannot be found inside the germinated conidium (Gc). Notice the total melanization of the appressorium (Ap) and a clear region which corresponds to the pore (arrow). $\times 1,000$.



FIGURES 5 and 6 Ungerminated conidium. The ungerminated conidium cross-section shows that the cytoplasm is completely filled with lipid bodies (arrows) (Fig. 5). Bar = 1 μ m. Glycogen-like granules in the cytoplasm periphery (arrowhead), lipid bodies (lb), plasma membrane (between arrows) and cell wall (cw) are observed (Fig. 6). Bar = 200 nm.

FIGURE 7 Aspects of a germinated conidium on a cellophane membrane (cm). Arrowheads delimit germinated conidium (Gc), germ tube (Gt) and appressorium (Ap). Vacuoles (v) in germinated conidia (Gc) and germ tube (Gt) are observed. The germ tube is separated from the appressorium by a septum (s). Lipid bodies (lb), which are next to vesicles (arrows), are observed inside the appressorium. Bar = 1 μ m.

FIGURE 8 Acid phosphatase reaction product in the germ tube vacuole. The reaction product is observed in association with the membrane (arrow) and free in the vacuolar lumen (arrowhead). Bar = 1 μ m.



FIGURES 9 and 10 Initial stages of the penetration process into cellophane membranes. (Fig. 9) Appressorium plasma membrane (arrowhead) juxtapsed to the cellophane membrane (cm) at the pore region. Two nuclei (n), lipid bodies (lb) and vesicle (v) are observed. Extracellular matrix (asterisk) contacts the cellophane surface. Bar = 1 μ m. (Fig. 10) An electron dense material (arrow) is observed at the cellophane membrane (cm) in the region below the pore. Bar = 200 nm.

FIGURE 11 Details of appressorium ultrastructure. Close association of microbodies (mb), mitochondria (m), vesicles (v) and lipid bodies (lb) is observed. Bar = 250 nm.

the appressorial cytoplasm exhibited lipid bodies, mitochondria, granular endoplasmic reticulum, numerous free ribosomes, vesicles (Figs. 7, 9 and 11) and microbodies (Fig. 11). The lipid bodies were frequently localized close to vesicles (Figs. 7, 9 and 11), as well as mitochondria and microbodies (Fig. 11).

Cell wall ultrastructure

The cell wall of ungerminated conidium is formed by a thick internal layer, which is more electron dense on the

side adjacent to the plasma membrane, and by an external thin layer (Fig. 6).

The germ tube cell wall and the conidium cell wall were similar in structure (Figs. 6 and 13).

Extracellular matrix may get in contact to the external side of the germ tube cell wall (Fig. 13).

The internal side of the appressorium cell wall had a thin electron dense layer (Fig. 12) and the external side was continuous with an extracellular matrix extending and adhering to the cellophane membrane (Figs. 9, 14 and 15).



FIGURES 12 to 15 Cell wall ultrastructure during germination. (Fig. 12) Appressorium cell wall. Densely stained thin layer adjacent to the plasma membrane (arrow), inner layer (il) and external layer (el) and extracellular matrix (asterisk) are observed. Bar = 50 nm. (Fig. 13) Germ tube (Gt) and appressorium (Ap). The germ tube cell wall (cw) near the appressorium (Ap) is connected with the extracellular matrix (asterisk). Bar = 100 nm. (Fig. 14) The extracellular matrix (asterisk), extends from the appressorium cell wall reaching the cellophane membrane (cm). Penetration peg (Pp) and the nucleus (n) are observed. Bar = 500 nm. (Fig. 15) Appressorium (Ap) exhibiting extracellular matrix (asterisk) connecting to the cellophane membrane (cm). Bar = 100 nm.

DISCUSSION

The presence of lipid bodies in ungerminated conidia has been reported previously in *C. graminicola* (Mims *et al.*, 1995), *C. gloeosporioides* (Kerrigan and Mims, 1993) and *C. truncatum* (Van Dyke and Mims, 1991). Since triglycerides represent the most common lipid class stored in other fungi (Beattie *et al.*, 1993; Gaspar *et al.*, 1994) they may also be of major significance in *C. graminicola*. Glycogen-like granules found in the ungerminated conidia (Fig. 6) exhibited appearance and distribution similar to *C. graminicola* glycogen, as demonstrated by cytochemical techniques (Mims *et al.*, 1995). The existence of lipids in the germ tube was shown in *Uromyces phaseoli* (Hoch and Staples, 1987) and in the appressorium of other fungi (Mims *et al.*, 1989; Mims and Richardson, 1989; Bourett and Howard, 1990), including *C. graminicola* germinated on leaves of maize and oats (Politis and Wheeler, 1973; Politis, 1976). Our observations indicate that lipid utilization begins during the initial steps of germination and progresses until its end. The dynamics of lipid transfer from the germinating conidium to the appressorium cannot be explained by the methodology that we have used. It is unclear whether the lipids are simply physically transported or transformed by chemical means while being transferred to a different compartment. Our results indicate that mobilization of lipids during germination is in agreement with studies which suggested lipid consumption in order to describe lipid processing during the germination of different fungi (Maxwell *et al.*, 1977; Gaspar *et al.*, 1994; Maia *et al.*, 1994). Besides their obvious role in energy supply, lipids may be utilized in the glyoxylate cycle (Maxwell *et al.*, 1977; Ruch *et al.*, 1991; Leite and Schadeck, 1996). The close association of microbodies and mitochondria to lipid bodies (Fig. 11) is strongly suggestive of this hypothesis (Mills and Cantino, 1975; Ruch and North, 1988; Ruch *et al.*, 1991).

Breakdown of macromolecular constituents is an important function of fungal vacuoles, but is also carries out several other cellular activities (Klionsky *et al.*, 1990). The deposition of an acid phosphatase reaction product in the germ tube vacuoles (Fig. 8) is indicative of lysosomal activity, as proposed for *Sclerotium rolfsii* (Hänssler *et al.*, 1975) and *Aspergillus flavus* vacuoles (Bojovic-Cvetic and Vujicic, 1982). Vacuole/lysosome is an expression often used to designate yeast vacuoles (Hirsch *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1997). Acid phosphatase activity was also demonstrated to be associated with the vesicular membrane and the central core of appressorial vesicles (unpublished results).

The pore region (Fig. 9) is similar to that observed in other fungi germinated on artificial membranes (Bourett and Howard, 1990; Van Dyke and Mims, 1991). However, a direct contact between appressorial plasma membrane and

the substratum surface was not reported in *C. graminicola* germinated on maize leaves (Politis and Wheeler, 1973). The electron dense material in the region right below the pore (Fig. 10) may contain cellulases. The participation of cellulases during the penetration process into artificial membranes has been previously suggested (Suzuki *et al.*, 1982; Bourett and Howard, 1990).

The abundant extracellular matrix (Figs. 9 and 12 to 15) appears to adhere appressoria to cellophane membrane (Figs. 9, 14 and 15). This adhesive function has been attributed to an extracellular matrix in association with germ tube and appressoria in various fungi (Mims *et al.*, 1989; Bourett and Howard, 1990; Chaubal *et al.*, 1991; Van Dyke and Mims, 1991). In *Puccinia sorghi*, the extracellular matrix is mainly composed of a glycoprotein rich in acidic amino acids and β -1,3-glucans, which appear to be responsible for the adhesion (Chaubal *et al.*, 1991). In *C. graminicola* the adhesive material was suggested to be a mannose rich glycoprotein (Sugui *et al.*, in press).

Infection structures formed on cellophane membranes provide a useful approach for investigating the effects of molecules or conditions that might modulate fungal development (Howard and Valent, 1996). In the present work we gave special attention to the lipid content before and after germination had started. We have recently suggested that the glyoxylate cycle may be under the control of a self-inhibitor of the germination, produced by *C. graminicola* (Leite and Nicholson, 1992; Leite and Schadeck, 1996). It is our goal to contribute for the understanding of how fungi control the germination process.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. Fabio O. Pedrosa for supporting our research and for providing precious resources and equipment throughout the entire investigation, and to Dr. Philip A. Gorin and Dr. Janyce A. Sugui for critically reviewing the manuscript.

Research funding provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (Grant: 521662/94-O) and by the Federal University of Paraná (Grant: 95004508/Funpar).

REFERENCES

- BABA M., OSUMI M., SCOTT V.S., KLIONSKY D.J. and OHSUMI Y., 1997. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.*, **139**, 1687-1695.
- BEATTIE S.E., STAFFORD A.E. and KING JR. A.D., 1993. Reevaluation of the neutral lipids of *Tilletia controversa* and *Tilletia tritici*. *Lipids*, **28**, 1041-1043.
- BOJOVIC-CVETIC D. and VUJICIC R., 1982. Acid phosphatase and distribution in *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **79**, 137-141.
- BOURETT T.M. and HOWARD R.J., 1990. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.*, **68**, 329-342.

- BUCHI D.F. and SOUZA W., 1992. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **24**, 135-141.
- CHAUBAL R., WILMONT V.A. and WILLARD K.W., 1991. Visualization, adhesiveness and cytochemistry of the extracellular matrix produced by urediniospore germ tubes of *Puccinia sorghi*. *Can. J. Bot.*, **69**, 2044-2054.
- CULLING C.F.A., 1983. 'Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques'. Butterworth and Co. Ltd., London, United Kingdom, 3rd ed.
- GASPAR M.L., POLLERO R.J. and CABELLO M.N., 1994. Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *JAOCs*, **71**, 449-452.
- HÄNSSLER G., MAXWELL D.P. and MAXWELL M.D., 1975. Demonstration of acid phosphatase-containing vacuoles in hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. *J. Bacteriol.*, **124**, 997-1006.
- HIRSCH H., SCHIFFER H.H. and WOLF D.H., 1992. Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). *J. Biochem.*, **207**, 867-876.
- HOCH H.C. and STAPLES R.C., 1987. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**, 231-247.
- HOWARD R.J. and VALENT B., 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 491-512.
- KERRIGAN J. and MIMS C.W., 1993. Ultrastructural and cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. *BEAM Newsl. Southeast. Electron Microsc. Soc.*, **9**, 21-25.
- KLIONSKY D.J., HERMAN P.K. and EMR S.D., 1990. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **54**, 266-292.
- LEITE B. and NICHOLSON R.L., 1992. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp. Mycol.*, **16**, 76-86.
- LEITE B. and SCHADECK R.J.G., 1996. Mycosporines: importance in the germination process of fungal spores. *Fitopatol. Brasil.*, **21**, 149-155.
- MAIA L.C., KIMBROUGH J.W. and BENNY G.L., 1994. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). *Mycologia*, **86**, 343-349.
- MAXWELL D.P., ARMENTROUT V.N. and GRAVES JR. L.B., 1977. Microbodies in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **15**, 119-134.
- MEIRELLES M.N.L. and SOUZA W., 1986. The fate of plasma membrane macrophage enzyme markers during endocytosis of *Trypanosoma cruzi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **18**, 99-107.
- MIMS C.W., 1991. Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. *Mycologia*, **83**, 1-19.
- MIMS C.W. and RICHARDSON E.A., 1989. Ultrastructure of appressorium development by basidiopore germings of the rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Protoplasma*, **148**, 11-119.
- MIMS C.W., TAYLOR J. and RICHARDSON E.A., 1989. Ultrastructure of the early stages of infection of peanut leaves by the rust fungus *Puccinia arachidis*. *Can. J. Bot.*, **67**, 3570-3579.
- MIMS C.W., RICHARDSON E.A., CLAY R.P. and NICHOLSON R.L., 1995. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Int. J. Plant. Sci.*, **156**, 9-18.
- MILLS G.L. and CANTINO E.C., 1975. Isolation and characterization of microbodies and symphyomicrobodies with different buoyant densities from the fungus *Blastocladiella emersonii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1256-1263.
- NICHOLSON R.L. and MORAES W.B.C., 1980. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. *Phytopathology*, **70**, 255-261.
- NICHOLSON R.L., BUTLER L.G. and ASQUITH T.N., 1986. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, **76**, 1315-1318.
- NICHOLSON R.L., HIPSKIND J. and HANAU R.M., 1989. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **35**, 243-252.
- POLITIS D.J., 1976. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, **8**, 117-122.
- POLITIS D.J. and WHEELER H., 1973. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 465-471.
- RUCH D.G. and NORTH M.C., 1988. Ultrastructure of dormant basidiospores of *Agaricus campestris*. *Can. J. Bot.*, **66**, 583-587.
- RUCH D.G., BURTON K.W. and INGRAM L., 1991. Occurrence of the glyoxylate cycle in basidiospores of homobasidiomycetes. *Mycologia*, **83**, 821-825.
- SUZUKI K., FURUSAWA I., ISHIDA N. and YAMAMOTO M., 1982. Chemical dissolution of cellulose membranes as a prerequisite for penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1035-1039.
- VAN DYKE C.G. and MIMS C.W., 1991. Ultrastructure of conidia, conidium germination, and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. *Can. J. Bot.*, **69**, 2455-2467.

REVISÃO

MICOSPORINAS: PAPEL NO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS EM FUNGOS

B. LEITE¹ & R.J.G. SCHADECK²

¹Departamento de Bioquímica - Caixa Postal 19046, 81531-970 e ²Departamento de Biologia Celular - 19031, CEP 81532-970, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

(Aceito para publicação em 25/03/96)

LEITE, B. & SCHADECK, R.J.G. Micosporinas: papel no processo de germinação de esporos em fungos. *Fitopatol. bras.* 21: 149-155. 1996.

RESUMO

As micosporinas são metabólitos secundários que podem ser isolados a partir de diversos grupos de fungos desde zigomicetos até ferrugens. Apesar disto, as questões básicas relativas ao significado fisiológico-bioquímico destes compostos permanecem sem resposta. Recentemente, uma micosporina foi apontada como tendo atividade de auto-inibidor de germinação de conídios de *Colletotrichum graminicola*, agente causador da antracnose em sorgo e milho. A possibilidade de que as micosporinas tenham controle sobre a germinação de conídios e no desenvolvimento de hifas vem sendo investigada. Por exemplo, é possível que as mesmas

estejam envolvidas no controle do ciclo do glioxilato, o qual é responsável pela conversão de lipídeos em carboidratos. É interessante, em vista da ampla distribuição das micosporinas, considerar a hipótese de que este controle bioquímico apresente características comuns a todos os gêneros de fungos. Estas características poderiam estar relacionadas com etapas do processo de germinação e serem total ou parcialmente reguladas por micosporinas.

Palavras chave: micosporina, germinação, fungos, ciclo do glioxilato.

ABSTRACT

Mycosporines: importance in the germination process of fungal spores

Mycosporines are secondary metabolites which can be isolated from groups of fungi as diverse as zygomycetes and rusts. Basic questions relative to the physiological and biochemical significance of these compounds remain unanswered. Recently, a mycosporine was demonstrated to be a germination self-inhibitor of conidia of *Colletotrichum graminicola*, the causal agent of sorghum and corn anthracnose. The possibility that these compounds have significant roles in the germination of conidia and germling morphogenesis is

being investigate. For example, it is possible that they are involved in the control of the glyoxilate cycle, which is responsible for the conversion of lipids into carbohydrates. It is interesting, based on the distribution of mycosporines, to consider the hypothesis that this biochemical control may have common characteristics among different fungal genera. These characteristics could be founded in mechanisms related to steps of the germination process which ultimately could be totally or partially regulated by mycosporines.

INTRODUÇÃO

Micosporinas são compostos secundários que apresentam pico de absorvância espectrofotométrica máximo na região de 310 nm, sendo produzidos por várias espécies de

fungos. Muito embora estes compostos estejam relativamente bem caracterizados em termos de distribuição e aspectos estruturais (Arpin & Bouillant, 1981), tendo os primeiros estudos nesta linha sido iniciados alguns anos atrás (Leach, 1965; Favre-Bonvin *et al.*, 1976), a função dos mesmos permanece alvo de especulação (Favre-Bonvin *et al.*, 1987).

Por exemplo, Young & Patterson (1982) demonstraram a proteção contra radiação ultravioleta conferida por micospolina obtida a partir de *Glomerella cingulata*, embora Brook (1981) já tivesse sugerido esta função, apesar de, na época, não ter tratado o metabólito pela denominação micospolina, o qual chamou simplesmente de "composto P 310".

Uma nova perspectiva surgiu em função do isolamento e caracterização da micospolina-alanina, a partir da mucilagem que envolve os conídios de *Colletotrichum graminicola*. O referido composto tem função de auto-inibidor, bloqueando a formação de tubo germinativos e de apressórios (Leite & Nicholson, 1992). Dentro do quadro geral de caracterização das micospolinas, o trabalho com a micospolina-alanina representa a primeira publicação onde um dos compostos do grupo é apontado como tendo efeito supressor sobre a germinação. As micospolinas apresentam um número considerável de características que se ajustam ao modelo hipotético de mecanismos de auto-inibição proposto por Gottlieb (1973). Assim, a idéia de que estes compostos tenham uma função mais geral na sobrevivência de fungos, através da supressão da atividade metabólica, até que a disseminação ocorra, representa hipótese plausível. A presente revisão procura alertar para o fato de que alguns mecanismos que influenciam no processo de germinação devem ser investigados com mais profundidade diante da perspectiva de que estes estejam relacionados com a atividade de micospolinas.

Particularidades estruturais das micospolinas

A presença de compostos secundários com absorvância específica em 310 nm (Figura 1) tem sido relatada em fungos desde a década de 60 (Leach, 1965; Trione *et al.*, 1966). Estes metabólitos foram isolados a partir de culturas em estágio de esporulação e tiveram sua estrutura química básica elucidada posteriormente (Favre-Bonvin *et al.*, 1976). Designados genericamente pelo termo "micospolinas", apresentam alta solubilidade em água e são constituídos de uma ciclohexanona (Figura 2a) substituída, ligada a um aminoácido ou aminoálcool, conforme Figura 2b (Arpin *et al.*, 1979; Bernillon *et al.*, 1984). As micospolinas diferem das normicospolinas (Figura 2c), as quais absorvem em 320 nm, somente pelo grupo ligado à posição assinalada pelo radical R_1 do anel ciclohexanona (Bernillon *et al.*, 1984). A estrutura química de uma série de micospolinas tem sido descrita, como as apresentadas na Figura 3. A mais nova micospolina demonstrada apresenta alanina (Figura 4) como porção nitrogenada e foi identificada na mucilagem de conídios de *C. graminicola* (Leite & Nicholson, 1992). Da mesma forma, estudos recentes apresentam evidências da existência de micospolinas na mucilagem de *Colletotrichum gloeosporioides* (Freitas Filho & Leite, 1994).

O conhecimento relativo às vias biossintéticas, para a produção de micospolinas, é ainda insuficiente. Entretanto, a participação da via do ácido shiquímico nas fases iniciais, a exemplo do que acontece com outros metabólitos secundários (Malick, 1982), foi demonstrada em estudos sobre a biossíntese de micospolina-glutaminol em *Trichothecium roseum* (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Por outro lado, Bernillon *et al.* (1984) isolaram, em diferentes estágios do desenvolvimento do fungo *Pyronema ophalodes*, os seguintes

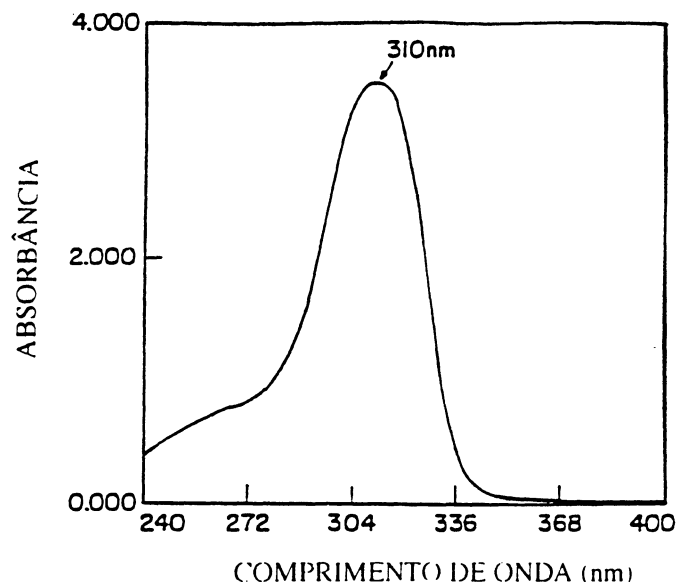


FIG. 1 - Espectro de absorção típico de micospolinas (adaptado de Leite & Nicholson, 1992).

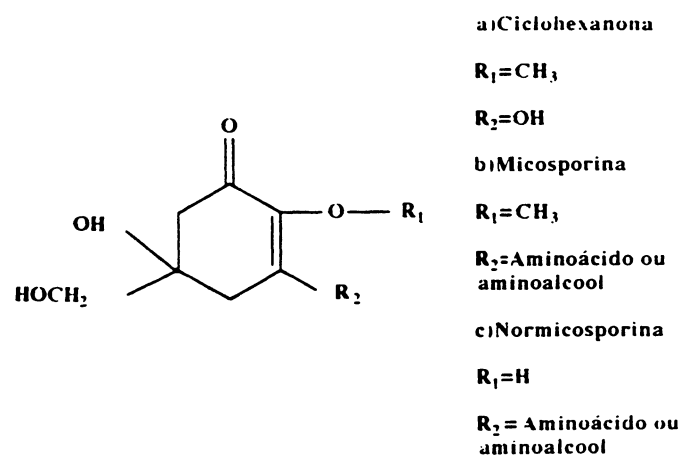


FIG. 2 - Comparação estrutural da substituição de radicais do anel de ciclohexanona: micospolinas e normicospolinas (adaptado de Young and Patterson, 1983).

compostos: normicospolina-glutamina, micospolina-glutamina e uma forma de micospolina glicosilada. Estes resultados levaram os autores a sugerir que existe uma via biossintética comum para a síntese desses compostos e que evoluiu no sentido de aumentar a estabilidade das moléculas geradas. De fato, a dinâmica metabólica, sugerida pelo grupo, foi demonstrada, através de análises espectrofotométricas, ou seja, extratos de micélio e apotécios apresentaram absorvância máxima em 320 nm e extratos de ascósporos maduros exibiram absorvância máxima na região de 310 nm, confirmando a presença de normicospolinas e micospolinas em diferentes estágios de desenvolvimento do fungo.

REGULADORES DE GERMINAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E HISTÓRICO

A germinação de conídios é controlada, essencialmente, pela informação genética contida no DNA, que assegura o

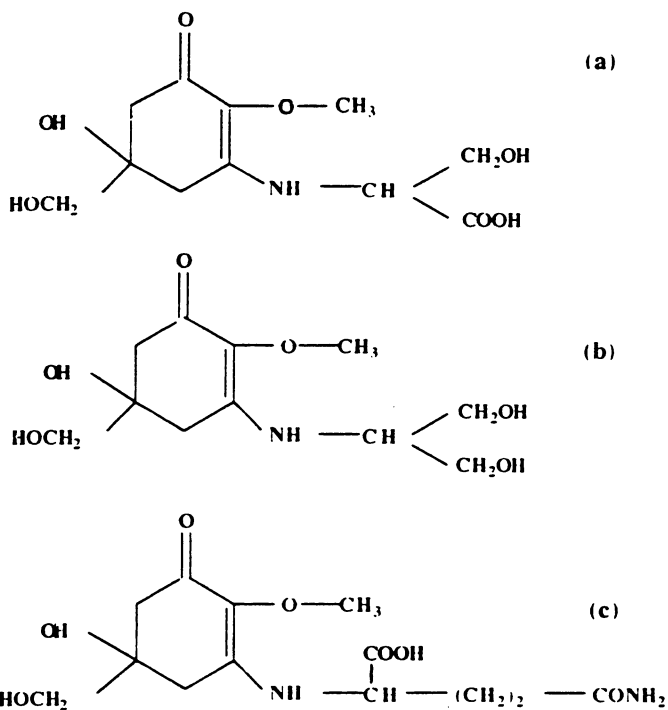


FIG. 3 - Estruturas químicas de algumas micosporinas já isoladas a partir de fungos: a) micosporina-serina (Arpin *et al.*, 1979); b) micosporina-serinol (Favre-Bonvin *et al.*, 1984); c) micosporina-glutamina (Bernillon *et al.*, 1984).

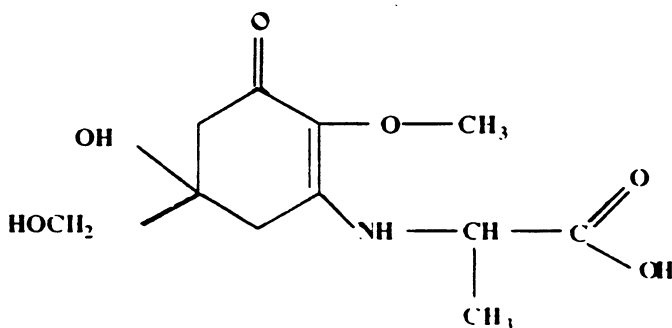


FIG. 4 - Micosporina-alanina, auto-inibidor de germinação isolado da mucilagem produzida por *Colletotrichum graminicola* (Leite & Nicholson, 1992).

desenvolvimento dos fungos quando condições ideais de germinação são atingidas (Macko, 1981). Este controle resulta, em última análise, na produção de metabólitos secundários que incluem inibidores e estimulantes de germinação (Gottlieb, 1973; Macko, 1981; French, 1992). Profundos efeitos destes compostos sobre a morfogênese, no que diz respeito ao crescimento micelial e formação de corpos de frutificação, tem sido amplamente demonstrados por diferentes grupos (Allen, 1976). Procuraremos enfatizar a atividade dos inibidores endógenos, voláteis e não voláteis, sem ênfase no que concerne aos estimulantes endógenos. Muitos destes compostos são, na verdade, reguladores de germinação, dependentes do estágio de desenvolvimento do microrganismo que o produz, ora agindo como estimulante, ora como inibidor.

Um exemplo típico é o caso do extrato aquoso de *Geotrichum candidum*, que atua como inibidor da taxa de crescimento de hifas e de germinação em *Aspergillus flavus*, *Botrytis allii*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporum canis* e *Penicillium italicum*, sendo que o mesmo extrato estimula a germinação e taxa de crescimento de hifas em *Aspergillus fumigatus* (Tariq & Campbell, 1991)

Inibidores não-voláteis de germinação

O fenômeno da auto-inibição apresenta algumas características comuns, sendo que a mais importante é o bloqueio da germinação em condições de superpopulação, ou seja, os esporos não germinam quando a concentração dos mesmos excede os níveis ótimos (Macko *et al.*, 1970; Macko, 1981; Allen, 1976; Hobot & Gull, 1980; Lax *et al.*, 1985). A ausência de germinação, no corpo de frutificação, foi apontada por Macko (1981) como apresentando vantagens seletivas, evitando a germinação de um grande número de esporos ao mesmo tempo. Além disso, a afirmação sugere que a germinação de esporos, ainda em estágio de maturação, seria evitada.

A presença de auto-inibidores é, particularmente, comum entre espécies de *Colletotrichum*, porém a maioria das estruturas químicas destes metabólitos não é conhecida. Notadamente, as exceções são os inibidores propostos para *C. gloeosporioides*, a gloeosporona (Meyer *et al.*, 1983; Lax *et al.*, 1985) e para *C. graminicola*, a micosporina-alanina (Leite & Nicholson, 1992).

A principal característica da massa de conídios, produzida por espécies de *Colletotrichum* é a presença de material mucilaginoso, envolvendo cada conídio (Griffiths & Campbell, 1972; Nicholson & Moraes, 1980; Louis *et al.*, 1988; McRae & Stevens, 1990; Nicholson & Epstein, 1991; Bailey *et al.*, 1992). Esta mucilagem tem função geral de proteção dos esporos contra dessecação e contra o efeito de produtos tóxicos gerados durante o curso de desenvolvimento de lesões (Nicholson & Moraes, 1980; Nicholson *et al.*, 1986, 1989), sendo produzida durante a esporulação (Nicholson & Moraes, 1980; Nicholson *et al.*, 1989; Nicholson 1992). Além disso, a mucilagem, que envolve os conídios de *C. graminicola*, apresenta altas concentrações de micosporina-alanina, com função de auto-inibidor (Leite & Nicholson, 1992). É importante considerar que o efeito auto-inibidor da micosporina-alanina é de caráter temporal, sendo particularmente ativo quando os esporos se encontram nas fases de elevado potencial de germinação. Menores índices de atividade são verificados nas fases de senescência dos conídios, onde os mesmos exibem baixo potencial de germinação (Leite, 1992). Gottlieb (1973) ressaltou, em reflexão sobre germinação, que os auto-inibidores deveriam, por uma questão de lógica, estarem presentes no corpo de frutificação dos fungos onde a concentração de esporos é maior. Além disso, elaborou uma lista de características que estes compostos deveriam apresentar e cujos pontos mais importantes são: a) presença junto aos esporos, o que pode assegurar a sobrevivência do inóculo e garantir a subsequente dispersão dos mesmos; b) caráter hidrossolúvel; c) atividade em baixas concentrações; d) ausência de efeitos tóxicos.

Inibidores voláteis

Além do exposto acima, devemos também considerar a existência de auto-inibidores de germinação de caráter volátil, visto que grande parte das estruturas dos fungos durante o processo de desenvolvimento, se encontram na fase aérea, onde inibidores não-voláteis seriam ineficazes. Huntchison (1973) ressalta que muitas partes do micélio em crescimento seriam eficientemente atingidas pela ação de um produto volátil. De fato, os compostos produzidos e lançados à fase aérea, por uma cultura de fungo, são suficientes para inibir completamente a germinação de esporos coletados a partir da mesma colônia (Robinson & Park, 1966; Leite, 1993; Leite & Nicholson, 1993).

QUEBRA DE DORMÊNCIA, GERMINAÇÃO E CICLO DO GLIOXILATO

A germinação de esporos pode ser dividida em fases que envolvem, genericamente, absorção de água, aumento da atividade metabólica, e subsequente formação do tubo germinativo (Weete, 1974). Smith & Berry (1974) apontam para a existência de uma fase adicional que determina o crescimento das estruturas formadas nas fases anteriores. As sementes dos vegetais exibem um período de maturação, no qual a germinação se encontra bloqueada. Este período pode ser resultante da atividade de inibidores internos (Ting, 1982; Popinigis, 1977). O mesmo ocorre com esporos de fungos (Lax *et al.*, 1985; Leite & Nicholson, 1992). Em ambos os casos, os mecanismos de inibição envolvidos têm que ser anulados para permitir a germinação. O evento decisivo, nesta fase, é o aumento de umidade e conseqüente hidratação das estruturas do fungo. Na verdade, a embebição dos esporos muitas vezes coincide com o final da maturação e o início da germinação propriamente dita (Smith & Berry, 1974). Este fato está em concordância com a existência de auto-inibidores endógenos de germinação em fungos, os quais devem ser diluídos e/ou inativados para que o processo evolua. De fato, a existência de inibidores hidrossolúveis vem sendo defendida pois permite explicar com facilidade a remoção dos mesmos em caso de necessidade (Gottlieb, 1973; Leite & Nicholson, 1993).

A embebição é seguida de inúmeras mudanças no metabolismo das células envolvidas, inclusive no sentido de manter o constante fornecimento de moléculas combustíveis. A garantia do suprimento energético para a germinação é atribuída à reserva de lipídeos existente em muitos esporos de fungos (Maxwell *et al.*, 1977; Ruch *et al.*, 1991; Mims *et al.*, 1994). A utilização das reservas de lipídeos na forma insolúvel acontece, em grande parte devido à atividade do ciclo do glioxilato, observado em bactérias, fungos e plantas superiores (Gottlieb & Ramachandran, 1960; Caltrider *et al.*, 1963; Tolbert & Essner, 1981). O ciclo do glioxilato converte lipídeos em carboidratos na forma solúvel, os quais são facilmente transportáveis aos pontos de crescimento (Popinigis, 1977; Ruch *et al.*, 1991). Este ciclo apresenta enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, além das enzimas chaves isocitrato liase e malato sintase (Tolbert &

Essner, 1981). A via permite a conversão do acetil CoA, produzido pela β -oxidação dos ácidos graxos, a succinato e glioxilato, que através de várias reações, resultam na produção de malato e oxaloacetato (OAA). O OAA formado nestas reações, origina o fosfoenolpiruvato, processado na gliconeogênese, resultando na formação de glicose e outros intermediários de várias vias metabólicas (Gottlieb & Ramachandran, 1960; Caltrider *et al.*, 1963; Hall *et al.*, 1984; Ruch *et al.*, 1991). Além disso, o ciclo do glioxilato pode fornecer cadeias de quatro carbonos para a biossíntese de aminoácidos (Caltrider *et al.*, 1963; Maxwell *et al.*, 1977; Ruch *et al.*, 1991).

A utilização dos lipídeos durante a germinação é comprovada pela diminuição das reservas lipídicas durante esse processo (Caltrider *et al.*, 1963; Mims, 1971; Maxwell *et al.*, 1977). É importante ressaltar que as enzimas do ciclo do glioxilato estão presentes em esporos de fungos (Gottlieb & Ramachandran, 1960; Caltrider *et al.*, 1963; Weete, 1974; Maxwell *et al.*, 1977; Agy & Paznokas, 1985; Ruch *et al.*, 1991). A proximidade de gotículas de lipídeos e microcorpos (denominados glioxisomas quando apresentam enzimas do ciclo do glioxilato) tem sido observada, o que sugere o envolvimento destas organelas na utilização das reservas de lipídeos (Maxwell *et al.*, 1977; Tolbert & Essner, 1981; Ruch & North, 1988). Observa-se também que esporos de fungos podem germinar sem necessidade de nutrientes exógenos, somente em presença de água, indicando que as fontes nutricionais utilizadas durante a germinação são endógenas (Caltrider, 1963; Leite & Nicholson, 1992). Em vista do exposto, não é difícil supor que um dos principais responsáveis pelo fornecimento desses nutrientes seja o ciclo do glioxilato. Essa hipótese está de acordo com a constatação de que enzimas desse ciclo encontram-se muito ativas durante a germinação de esporos de fungos (Gottlieb & Ramachandran, 1960; Agy & Paznokas, 1985), e em sementes de oleaginosas, nas quais atingem velocidade máxima quando a degradação de lipídeos e a síntese de sacarose estão no auge (Popinigis, 1977). De fato, em vegetais está bem comprovado que o ciclo do glioxilato se encontra muito ativo durante esse processo (Cooper & Beevers, 1969; Gerhardt & Beevers, 1970; Labouriau, 1983), e tem sido amplamente sugerido que este ciclo funciona de maneira similar na germinação de fungos (Weete, 1974; Maxwell *et al.*, 1977; Agy & Paznokas, 1985; Ruch *et al.*, 1991). O trabalho desenvolvido por Agy & Paznokas (1985), reforça esta hipótese. Estes autores demonstraram que a inibição da enzima isocitrato liase pelo ácido itacônico resulta em inibição de germinação e crescimento vegetativo do fungo *Coccidioides immitis*.

Ciclo do Glioxilato e micosporinas

Um importante efeito sobre a isocitrato liase, enzima chave do ciclo do glioxilato, foi observado em *Nectria galligena*. Ensaio *in vivo* com este fungo demonstraram que a micosporina utilizada nos testes reduz a atividade da referida enzima (Dehorter & Lacoste, 1989). Considerando que esta enzima é fundamental na utilização da reserva de lipídeos, conforme já discutido, a inibição da mesma por micosporina reforça a hipótese de que o controle da germinação em fungos pode envolver o metabolismo de lipídeos. Assim, a mo-

bilização de lipídeos, através do ciclo do glioxilato, levaria à produção de carboidratos solúveis e outros metabólitos necessários ao fungo (Figura 5). Neste sentido, são significa-

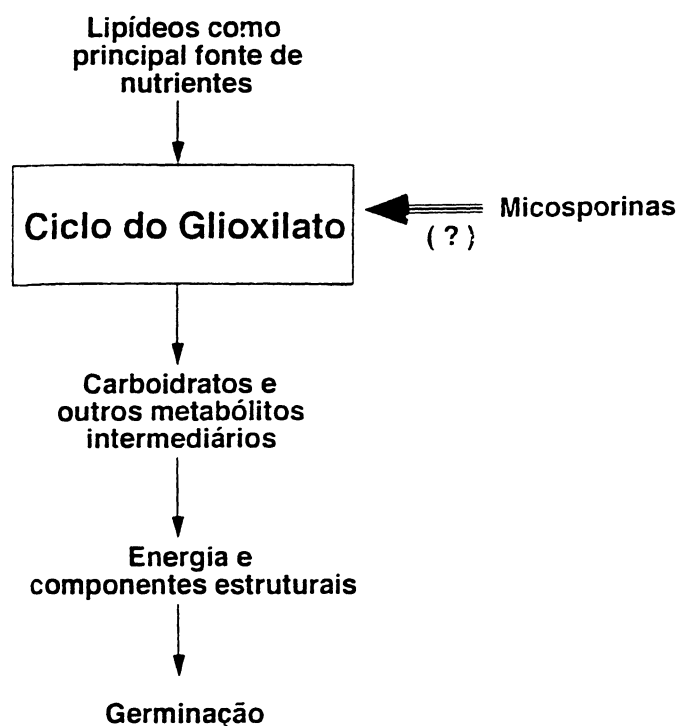


FIG. 5 - Esquema hipotético representado a possível participação de micosporinas na regulação do metabolismo de lipídeos.

tivos os estudos ultraestruturais em espécies de *C. graminicola* e *C. gloeosporioides* que demonstram um expressivo acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma de conídios jovens (Kerrigan & Mims, 1993; Mims *et al.*, 1994). Os trabalhos mostram ainda que existe uma forte correlação entre o envelhecimento conidial e a diminuição do número e tamanho de gotículas lipídicas, que o citoplasma dos conídios apresenta numerosos microcorpos e que alguns padrões estruturais são alterados por ação de micosporinas. Os microcorpos detectados em *C. graminicola* não tiveram ainda sua atividade relacionada com o ciclo do glioxilato. Uma vez que microcorpos de muitos fungos apresentam enzimas deste ciclo (Mills & Cantino, 1975; Mishina *et al.*, 1978; Moreno de la Garza *et al.*, 1985) é lógico assumir que alguns dos microcorpos observados em *C. graminicola* possam representar glioxisomas. Desta maneira, é importante a caracterização bioquímica e estrutural mais aprofundada dessas estruturas, bem como estudos sobre a dinâmica temporal das mesmas durante o desenvolvimento do fungo. Considerando o efeito inibidor da germinação de conídios de *C. graminicola* pela micosporina-alanina (Leite & Nicholson, 1993), e considerando ainda que esses esporos apresentam elevado conteúdo de reservas de lipídeos (Mims *et al.* 1994), também parece lógico admitir que o papel de auto-inibidor da micosporina-alanina estaria relacionado com a inibição do ciclo do glioxilato.

COMENTÁRIOS FINAIS

O controle da germinação em fungos, como vem sendo apresentado, está longe de representar um modelo aplicável a todos os grupos. A complexidade dos mecanismos envolvidos e a falta de informações básicas sobre o metabolismo secundário e seus efeitos na biologia de fungos tem contribuído para o estabelecimento de um quadro equivocado relativo à matéria. Ao mesmo tempo que é preciso explicar a inibição por compostos não-voláteis produzidos por fungos, a germinação controlada por compostos voláteis deve ser considerada, uma vez que parece existir um mecanismo combinando estes componentes de controle até a quebra de dormência. O fenômeno de mobilização de reservas de lipídeos, através do ciclo do glioxilato durante a germinação, bastante estudado em sementes de vegetais, parece também ser comum em espécies de fungos que armazenam lipídeos. Diante de todas as evidências apresentadas, é imperativa a investigação em profundidade do papel das micosporinas na coordenação de eventos da germinação em fungos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Glaci T. Zancan (UFPR) e ao Dr. Sérgio F. Pascholati (ESALQ/USP) pelas críticas e sugestões. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGY, M.B. & PAZNOKAS, J.L. Isocitrate lyase and malate synthase activities of *Coccidioides immitis*. *Exp. Mycol.* 9: 318-325. 1985.
- ALLEN, P.J. Control of spore germination and infection structure formation in the fungi. In: Heitefuss, R. & Williams, P.H. eds. *Physiological plant pathology*. New York, Springer-Verlag. 1976. p. 51-85.
- ARPIN, N.; CURT, R. & FAVRE-BONVIN, J. Mycosporines: mise au point et données nouvelles concernant leurs structures, leur distribution, leur localisation et leur biogénese. *Rev. Mycol.* 43: 247-257. 1979.
- ARPIN, N. & BOUILLANT, M.L. Light and mycosporines. In: Turian, G. & Hohl, H. R. eds. *The fungal spore: morphogenetic controls*. London, Academic Press. 1981. p. 435-454.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J. & NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J. A. & Jeger, M. J. eds. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology. CAB International. 1992. p. 88-120.
- BERNILLON, J.; BOUILLANT, M.L.; PITTET, J.L.; FAVRE-BONVIN, J. & ARPIN, N. Mycosporine-glutamine and related mycosporines in the fungus *Pyronema omphalodes*. *Phytochemistry* 23: 1083-1087. 1984.
- BROOK, P.J. Protective function of an ultraviolet-absorbing compound associated with conidia of *Glomerella cingulata*. *N. Z. J. Botany* 19: 299-304. 1981.

- CALTRIDER, P.G.; RAMACHANDRAN, S. & GOTTLIEB, D. Metabolism during germination and function of glyoxylate enzymes in uredospores of rust fungi. *Phytopathology* 53: 86-92. 1963.
- COOPER, T.G. & BEEVERS, H. β -Oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* 244: 3514-3520. 1969.
- DEHORTER, B. & LACOSTE, L. Photo-induction sexuée du pyrénomycète *Nectria galligena*: influence de la mycosporine sur le rapport des activités NADP⁺-isocitrate déshydrogénase/isocitrate lyase. *Can. J. Bot.* 67: 447-450. 1989.
- FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N. & BREVARD, C. Structure de la mycosporine (P-310). *Can. J. Chem.* 54: 1105-1113. 1976.
- FAVRE-BONVIN, J.; BERNILLON, J.; SALIN, N. & ARPIN, N. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 26: 2509-2514. 1987.
- FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. *Mycologia* 84: 277-288. 1992.
- FREITAS FILHO, D. & LEITE, B. Produção de micospolina por culturas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fitopatol. bras.* 19: 309. 1994.
- GERHARDT, B.P. & BEEVERS, H. Developmental studies on glyoxysomes in *Ricinus* endosperm. *J. Cell. Biol.* 44: 94-102. 1970.
- GOTTLIEB, D. Endogenous inhibitors of spore germination. *Phytopathology* 63: 1326-1327. 1973.
- GOTTLIEB, D. & RAMACHANDRAN, S. The nature of production of the glyoxylate pathway enzymes in germinating spores of *Penicillium oxalicum*. *Mycologia* 52: 599-607. 1960.
- GRIFFITHS, D.A. & CAMPBELL, W.P. Fine structure of conidial development in *Colletotrichum atramentarium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 59: 483-489. 1972.
- HALL, J.L.; FLOWERS, T.J. & ROBERTS, R.M. Plant cell structure and metabolism. 2nd ed. London, Longman Group Limited. 1984.
- HOBOT, J.A. & GÜLL, K. The identification of a self-inhibitor from *Syncephalastrum racemosum* and its effect upon sporangiospore germination. *Antonie van Leeuwenhoek* 46: 435-441. 1980.
- HUTCHINSON, S.A. Biological activities of volatile fungal metabolites. *Ann. Rev. Phytopathol.* 11: 223-246. 1973.
- KERRIGAN, J. & MIMS, C.W. Ultrastructural and cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. *The BEAM Newsletter of the Southeastern Electron Microscopy Society* 9: 21-25. 1993.
- LABOURIAU, L.G. A germinação de sementes. Washington, D.C. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos. 1983.
- LAX, A.R.; TEMPLETON, G.E. & MEYER, W.L. Isolation, purification, and biological activity of a self-inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 75: 386-390. 1985.
- LEACH, C.M. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Can. J. Bot.* 43: 185-200. 1965.
- LEITE, B. Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development. West Lafayette. Tese de Doutorado, Purdue University. 1992.
- LEITE, B. Controle de germinação em *Colletotrichum graminicola*: mecanismos e perspectivas. *Summa Phytopathol.* 19: 55-59. 1993.
- LEITE, B. & NICHOLSON, R.L. Mycosporine-alanine: a self inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp. Mycol.* 16: 76-86. 1992.
- LEITE, B. & NICHOLSON, R.L. A volatile self-inhibitor from *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* 85: 945-951. 1993.
- LOUIS, I.; CHEW, A. & LIM, G. Influence of spore density and extracellular conidial matrix on spore germination in *Colletotrichum capsici*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 694-697. 1988.
- MACKO, V.; STAPLES, R.C.; GERSHON, H. & RENWICK, J.A.A. Self-inhibitor of bean rust uredospores: methyl 3,4-dimethoxycinnamate. *Science* 170: 539-540. 1970.
- MACKO, V. Inhibitors and stimulants of spore germination and infection structure formation in fungi. In: Turian, G. & Hohl, H.R. eds. *The fungal spore: morphogenetic controls*. New York. Academic Press. 1981. p. 565-584.
- MALIK, V. S. Genetic and biochemistry of secondary metabolism. In: *Advances in applied microbiology*. Virginia, Academic Press. 1982. p. 27 - 115.
- MAXWELL, D.P.; ARMENTROUT, V.N. & GRAVES, L.B.Jr. Microbodies in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 119-134. 1977.
- McRAE, C.F. & STEVENS, G.R. Role of conidial matrix of *Colletotrichum orbiculare* in pathogenesis of *Xanthium spinosum*. *Mycol. Res.* 94: 890-896. 1990.
- MEYER, W.L.; LAX, A.R.; TEMPLETON, G.E. & BRANNON, M.J. The structure of gloeosporone, a novel germination self-inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tetrahedron Lett.* 24: 5059-5062. 1983.
- MIMS, C.W. An ultrastructural study of spore germination in the myxomycete *Arcyria cinerea*. *Mycologia* 63: 586-601. 1971.
- MIMS, C.W.; RICHARDSON, E.A.; CLAY, R. & NICHOLSON, R.L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Int. J. Plant. Sci.* 156: 9-18. 1995.
- MILLS, G.L. & CANTINO, E.C. Isolation and characterization of microbodies and symphyomicrobodies with different buoyant densities from the fungus *Blastocladiella emersonii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 1256-1263. 1975.

- MISHINA, M.; KAMIRYO, T.; TASHIRO, S.; HAGIHARA, T.; TANAKA, A.; FUKUI, S.; OSUMI, M. & NUMA, S. Subcellular localization of two long-chain acyl-coenzima-A synthetases in *Candida lipolytica*. Eur. J. Biochem. 89: 321-328. 1978.
- MORENO DE LA GARZA, M.; SHULTZ-BORCHARD, U.; CRABB, J.W. & KUNAU, W.-H. Peroxisomal -Oxidation systems of *Candida tropicalis*. Purification of a multifunctional protein possessing enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and 3-hydroxyacyl-CoA epimerase activities. Eur. J. Biochem. 148: 285-292. 1985.
- NICHOLSON, R.L. *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and sorghum. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. eds. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology. CAB International. 1992. p. 186-202.
- NICHOLSON, R.L. & MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. Phytopathology 70: 255-261. 1980.
- NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. & ASQUITH, T.N. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: Implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. Phytopathology 76: 1315-1318. 1986.
- NICHOLSON, R.L.; HIPSKIND, J. & HANAU, R.M. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. Physiol. Mol. Plant Pathol. 35: 243-252. 1989.
- NICHOLSON, R.L. & EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface, prerequisite for pathogenesis. In: Cole, G.T. & Hoch, H.C. eds. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York. Plenum Press. 1991. p. 3-23.
- POPINIGIS, F. Fisiologia da Semente. Brasília. AGIPLAN. 1977.
- ROBINSON, P.M. & PARK, D. Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 49: 639-649. 1966.
- RUCH, D.G. & NORTH, M.C. Ultrastructure of dormant basidiospores of *Agaricus campestris*. Can. J. Bot. 66: 583-587. 1988.
- RUCH, D.G.; BURTON, K.W. & INGRAM, L.A. Occurrence of the glyoxylate cycle in basidiospores of homobasidiomycetes. Mycologia 83: 821-825. 1991.
- SMITH, J.E. & BERRY, D. R. An introduction to biochemistry of fungal development. London, Academic Press. 1974.
- TARIQ, V.N. & CAMPBELL, V. M. Influence of volatile metabolites from *Geotrichum candidum* on other fungi. Mycol. Res. 95: 891-893. 1991.
- TING, I. P. Plant Physiology. University of California, Riverside. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1982.
- TOLBERT, N. E. & ESSNER, E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. J. Cell. Biol. 91: 271s-283s. 1981.
- TRIONE, E. J.; LEACH, C.M. & MUTCH, J.T. Sporogenic substances isolated from fungi. Nature 212: 163-164. 1966.
- WEETE, J. D. Fungal lipid biochemistry. New York, Plenum Press. 1974.
- YOUNG, H. & PATTERSON, J.V. A UV protective compound from *Glomerella cingulata* - a mycosporine. Phytochemistry 21:1075-1077. 1982.