

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Claudia Alves da Silva

INFLUÊNCIA DA ESTRUTURA DE POLISSACARÍDEOS
PÉCTICOS DE *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*
(Rubiaceae) NA INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM
COTILÉDONES DE SOJA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Claudia Alves da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.

marcelo

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

Orientadora: Dra. Márcia Regina Braga

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANT

UNIDADE 80
 Nº CHAMADA T/UNICAMP
Si38i

V 48314
 PREÇO 16.837,10

PREÇO R\$ 11,00
 DATA 17/04/02
 Nº CPD

CM00166254-4

3 ID 236700

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Si38i **Silva, Claudia Alves da**
 Influência da estrutura de polissacarídeos pécticos de *Alibertia myrcifolia*
 e *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) na indução de fitoalexinas em
 cotilédones de soja/Claudia Alves da Silva. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2001
 103f: ilustr.

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

1. Pectinas. 2. Fitoalexinas. I. Braga, Márcia Regina. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

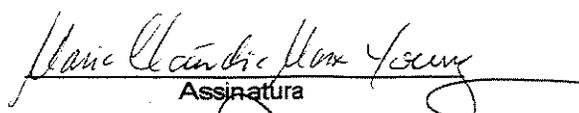
Data da Defesa: 09/11/2001

BANCA EXAMINADORA

Dra. Márcia Regina Braga (Orientadora)


Assinatura

Dra. Maria Cláudia Marx Young


Assinatura

Prof.Dr. Sérgio Florentino Pascholati


Assinatura

Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Assinatura

Ao meu esposo Claudemir, pela sua paciência e companheirismo em todos os momentos, pelo nosso amor...

Ofereço

Aos meus pais, Marta e Francisco, e aos meus irmãos Cristiano e Karina pelo apoio e incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem paz de espírito eu não teria finalizado este trabalho.

À Dra. Marcia Regina Braga, pela orientação criteriosa e pela confiança demonstrada.

Ao Dr. Marcos Buckeridge, por seu incentivo na pesquisa e apoio nas etapas finais do trabalho.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade de estagiar na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

A todos os pesquisadores, funcionários e estagiários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelo auxílio nas etapas deste trabalho.

Aos professores, funcionários e estagiários do Departamento de Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP.

À aluna Uyrá Zama e a Profa. Dra. Marie Anne Heidi Dolder, do Departamento de Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP pelo auxílio na Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Dr. Elliot W. Kitajima, do Departamento NAP/ MEPA da ESALQ, por disponibilizar o Microscópio Eletrônico de Transmissão.

À Dra. Edenise S. Alves pelo auxílio na preparação e análise do material por Microscopia de Luz.

Aos amigos: Clóvis Silva, Kelly, Liliana, Clóvis Oliveira, Denis, Henrique, Lourdes, Paula, Rodrigo, Gustavo, Josimara, Amanda Asega, Patricia Gaya, Marco Tiné, Miguel Minhoto, Ana Russa, Marília, entre outros, pela amizade e companheirismo.

À Seção de Sementes do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) pelo fornecimento de sementes de soja.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

ÍNDICE

RESUMO	7
SUMMARY	9
INTRODUÇÃO	11
Parede celular vegetal.....	11
Pectinas.....	16
Fitoalexinas.....	19
Oligossacarinas e o mecanismo de liberação de oligogalacturonídeos.....	22
Anatomia foliar em Rubiaceae.....	25
OBJETIVOS GERAIS	26
ARTIGO 1: “Influência da metilesterificação de pectinas de <i>Alibertia myrcifolia</i> (Spruce ex. Schum.) Schum. e <i>Rudgea jasminoides</i> (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae). na liberação e na atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em soja”.....	27
ARTIGO 2: “Aspectos morfo-anatômicos e citoquímicos de folhas de <i>Alibertia myrcifolia</i> (Spruce ex. Schum.) Schum. e <i>Rudgea jasminoides</i> (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae)”.....	72
CONCLUSÕES GERAIS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

RESUMO

Duas rubiáceas arbóreas tropicais, *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*, diferem com relação à capacidade de produzir fitoalexinas quando inoculadas com fungos, sendo que folhas de *A. myrcifolia* não respondem à indução mesmo quando uma grande variedade de fungos é utilizada. Essas espécies também apresentam diferenças na composição das pectinas das paredes celulares de suas folhas. Neste trabalho ambas espécies foram comparadas em relação ao mecanismo de liberação e atividade de oligossacarídeos de parede celular indutores de fitoalexinas em cotilédones de soja e em relação aos aspectos morfo-anatômicos e citoquímicos de suas folhas. O tratamento das paredes celulares de ambas espécies com um coquetel de enzimas fúngicas (Driselase), por diferentes períodos, mostrou que oligossacarídeos indutores de fitoalexinas em soja são liberados de ambas espécies, porém mais facilmente a partir de *R. jasminoides*, espécie que apresenta resposta fitoalexínica. A incubação com endopoligalacturonase (Endo-PG) revelou que, para *A. myrcifolia*, somente ocorre hidrólise de sua pectina após o tratamento prévio com pectina-metilesterase (PME), enquanto que *R. jasminoides* é facilmente hidrolisada, indicando a existência de diferenças no grau de metilesterificação (GM) de suas pectinas. Após o tratamento com PME, ocorreu, para ambas espécies, a liberação de oligossacarídeos com pequeno grau de polimerização que estariam inibindo a síntese de fitoalexinas induzida por fragmentos maiores e pelo eliciador do fungo *Mucor ramosissimus*.

As análises de caracteres morfo-anatômicos das folhas das duas rubiáceas por microscopia de luz (ML), eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), revelaram que ambas as folhas são do tipo dorsiventral, sendo observadas uma camada de células no parênquima paliçádico de *R. jasminoides* e duas no de *A. myrcifolia*. Diferenças foram

observadas no formato do pecíolo, na espessura da cutícula da epiderme adaxial e na organização do parênquima lacunoso entre as espécies. Diferenças marcantes também foram observadas nas colorações com Azul de Toluidina e Ácido Periódico/Reativo de Schiff (PAS), indicando predomínio de polissacarídeos pécticos de caráter ácido no mesofilo de *R. jasminoides*, confirmando as análises bioquímicas previamente realizadas. Em MET, a imunolocalização com anticorpos monoclonais, que reconhecem diferentes estruturas pécticas, também confirmou a pouca metilesterificação das pectinas presentes nas paredes celulares de *R. jasminoides*.

Embora os experimentos tenham sido conduzidos com cotilédones de soja, os resultados obtidos sugerem que a diferença no comportamento das duas rubiáceas com relação capacidade de produzir fitoalexinas pode estar relacionada ao mecanismo de liberação de oligossacarídeos indutores, como consequência das diferenças na composição, no grau de metilesterificação e na distribuição dos grupos metil-ésteres existentes nas frações pécticas de suas paredes celulares.

SUMMARY

Two woody Rubiaceae species from tropical forest, *Alibertia myrcifolia* and *Rudgea jasminoides* showed differences in relation to their capacity of producing phytoalexins. *A. myrcifolia* did not show any phytoalexin accumulation when challenged with different fungi. Differences in the composition of the pectins from cell walls were also observed between these two Rubiaceae. These species were compared in relation to the liberation and activity of phytoalexin-eliciting oligosaccharides derived from their leaf cell walls and active on soybean cotyledons. Cell wall hydrolysis with Driselase showed that eliciting oligosaccharides could be released from both species, although they are more easily obtained from *R. jasminoides*, which presents positive phytoalexin response. Incubation of the cell walls with endopolygalacturonase promoted the liberation of oligosaccharides from *R. jasminoides* but not from *A. myrcifolia*. Sequential hydrolyses with pectin-methylesterase and endopolygalacturonase that caused cell wall breakdown and releasing of oligosaccharides from *A. myrcifolia*, indicated the presence of pectins with different degrees of methylesterification between the two species. Additionally, oligosaccharides with low degree of polymerization (DP) derived from both species were shown to inhibit phytoalexin response induced by a fungal elicitor (from *Mucor ramosissimus*) or oligosaccharides with higher DP.

Light (ML), scanning (MEV) and transmission electron microscopy (MET) revealed for both species that the leaf blade is dorsiventral with one-layered palisade in *R. jasminoides* and a two-layered one in *A. myrcifolia*. Differences were observed in the petiole shape, thickness of adaxial cuticle and organization of the spongy parenchyma between the two species. Remarkable differences were also seen with regard to the Toluidine Blue and Periodic Acid/ Schiff Reactive (PAS) stainings, indicating the predominance of acidic material in the *R. jasminoides* mesophyll.

The immunolocalization analysis by MET confirmed the low degree of methylesterification of pectins from *R. jasminoides*.

Although the assays have been performed on soybean cotyledons, our results suggest that the distinctive behavior between the Rubiaceae species in relation to phytoalexin production might be due to differences in the liberation of eliciting oligosaccharides from their cell walls as a consequence of the differences in the composition and degree and pattern of the methylesterification of their pectins.

INTRODUÇÃO

Parede celular vegetal

Uma das principais diferenças entre as células animais e vegetais está na presença da parede celular nas plantas, um envoltório rígido que sustenta e protege o corpo vegetal. A parede celular representa a fronteira entre o protoplasto e o ambiente, atuando como um sistema altamente complexo e dinâmico. As características físicas e as funções biológicas da parede celular dependem de seus polímeros componentes e do modo como interagem (Van Cutsem & Messiaem 1994), embora suas propriedades possam variar com a espécie, o ambiente, o tipo de tecido e o estágio de desenvolvimento da planta.

Diversas funções são atribuídas à parede celular, como definir a forma e o tamanho celular, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, atuar sobre o transporte intercelular, participar da sinalização e do reconhecimento entre células, armazenar compostos de reserva e moléculas reguladoras e sinalizadoras que controlam diversos processos fisiológicos celulares e participar dos mecanismos de proteção contra microrganismos (Darvill *et al.* 1992, Aldington & Fry 1993).

Paredes celulares primárias (presentes em células em crescimento) e secundárias são compostas por carboidratos, glicoproteínas, água e compostos fenólicos, diferindo apenas na proporção destes componentes (Carpita & Gibeaut 1993). Os carboidratos, encontrados na forma de polissacarídeos, representam cerca de 90% da parede celular primária e podem ser agrupados de acordo com sua estrutura, função, distribuição e solubilidade. A classificação por solubilidade é a mais aceita, agrupando os polissacarídeos em celulose, hemiceluloses e pectinas.

A celulose é um polissacarídeo vegetal bastante abundante, sendo responsável por cerca de 15 a 30% da massa seca da parede celular primária e uma grande porcentagem da parede celular secundária. Existe na forma de microfibrilas, de estrutura cristalina, composta por diversos polímeros lineares de glucose ligados β -1,4, e unidos por pontes de hidrogênio (Carpita 1992, Carpita & McCann 2000).

As hemiceluloses compreendem uma família de polímeros ricos em glucose, xilose, ou arabinose, que possuem outras ramificações incluindo xilose, galactose e fucose. Os principais polissacarídeos hemicelulósicos compreendem os xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos, mananos e β -glucanos não celulósicos. As pectinas, por sua vez, constituem um grupo de polissacarídeos ácidos, de estrutura complexa e que formam a matriz da parede celular primária e da lamela média (Kohorn 2000).

As proteínas são componentes importantes das paredes celulares, representando até 10% da composição da parede primária. São, em sua grande maioria, glicosiladas e podem estar presentes no espaço apoplástico, como é o caso das enzimas e das arabinogalactano-proteínas, ou firmemente ligadas à parede, como componentes estruturais da mesma. Diversas outras proteínas são conhecidas, como por exemplo, as glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs), as lectinas, as extensinas e as expansinas (Kohorn 2000). As proteínas podem se associar a um ou mais carboidratos complexos da parede celular. Dentre as enzimas, podem ser destacadas as peroxidases, as metiltransferases, as galactosidases e as proteases.

A água também é um importante componente da parede celular, e seu conteúdo, apesar de variável, pode representar até 65% da massa fresca da mesma. Dentre os compostos fenólicos, a lignina é o componente mais conhecido, ocorrendo predominantemente em paredes secundárias (Fry 1988).

Embora a maior parte dos polímeros que compõem a parede celular tenha sido caracterizada quimicamente, vários modelos de organização estrutural já foram propostos. A principal dificuldade em estabelecer um modelo satisfatório está no fato da parede celular ser uma estrutura complexa e variável. A estrutura atualmente aceita é aquela descrita por Carpita & Gibeaut (1993), que propõem dois modelos distintos de paredes celulares primárias em angiospermas e sugerem como as mesmas são alteradas durante o processo de expansão celular.

O primeiro modelo (figura 1) é representativo de todas as dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas. Neste tipo de parede, denominado tipo I, há um primeiro domínio, onde as microfibrilas de celulose estão entrelaçadas com o xiloglucano, que corresponde a cerca de 50% da parede. Este domínio está imerso na matriz péctica, que corresponde ao segundo domínio e representa cerca de 30% da parede. O terceiro domínio seria representado pelas proteínas estruturais.

O segundo modelo (figura 2) representa o tipo de parede encontrado nas gramíneas e famílias relacionadas. Neste modelo, denominado tipo II, as microfibrilas de celulose estariam interconectadas pelo arabinoxilano. O xiloglucano e as pectinas estão presentes, porém em pequenas quantidades. Este tipo de parede é caracterizado pela síntese e degradação de β -glucanos não celulósicos, durante o processo de expansão celular.

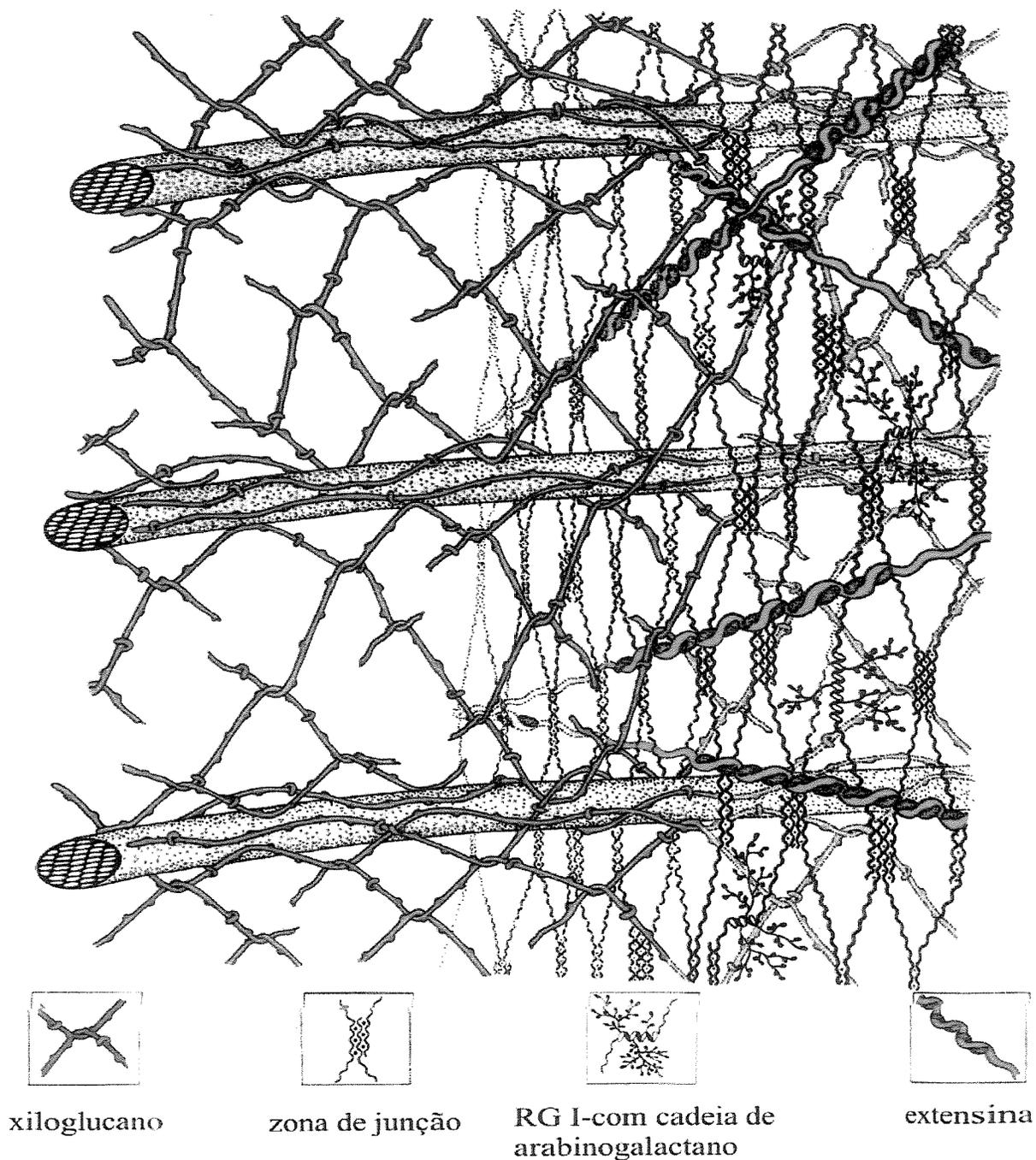


Figura 1. Modelo de organização estrutural de paredes celulares encontradas em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas, em expansão, ilustrando seus principais componentes, conforme proposto por Carpita & Gibeaut (1993). RG I: ramnogalacturonano I.

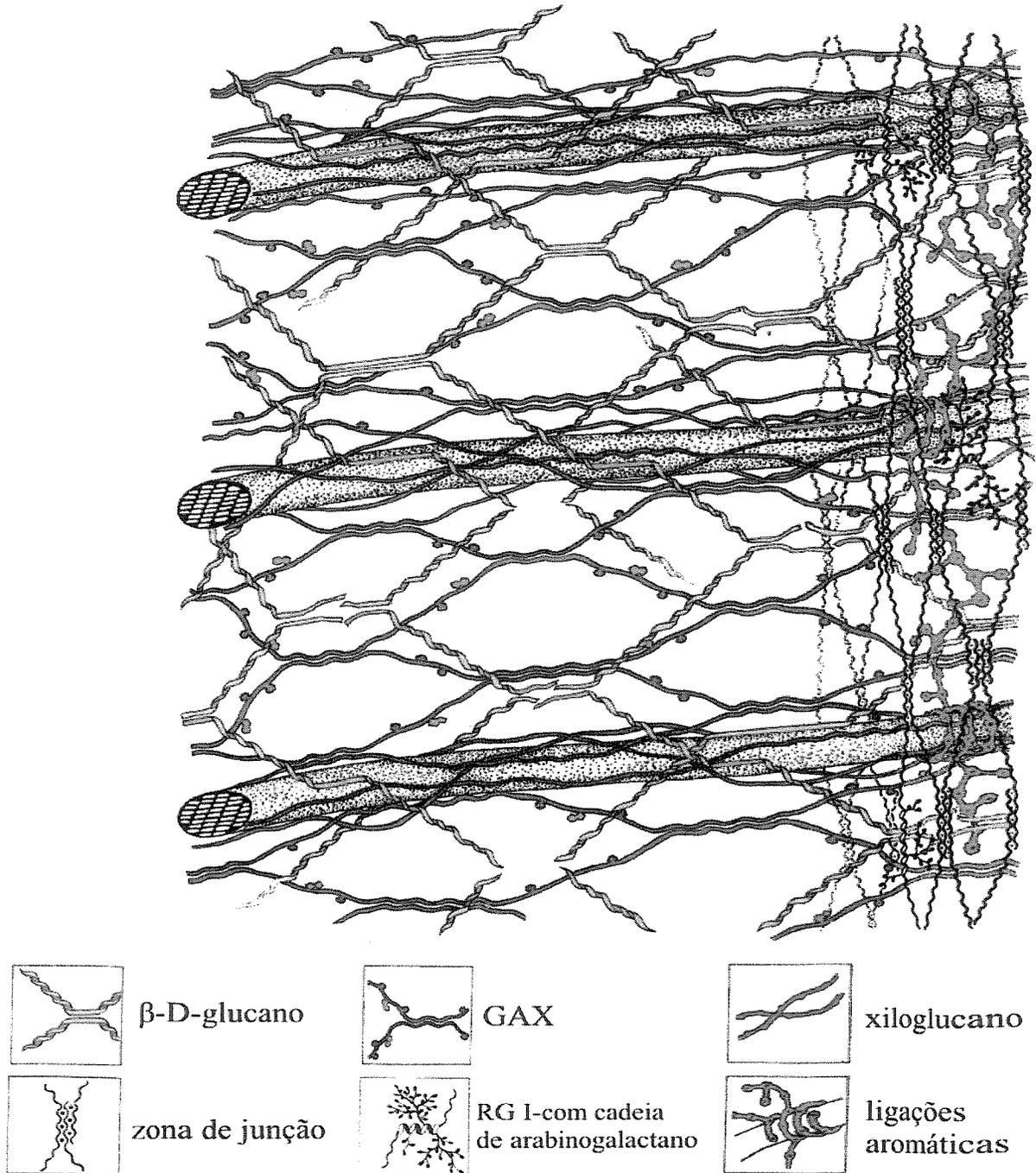


Figura 2. Modelo de organização estrutural de paredes celulares encontradas em gramíneas, em expansão, ilustrando seus principais componentes, conforme proposto por Carpita & Gibeaut (1993). GAX: glucuronoarabinoxilano, RG-I: ramnogalacturonano I.

Pectinas

As pectinas são caracterizadas por possuírem alto conteúdo de resíduos de ácido α -D-galacturônico (GalA). Os três maiores componentes da pectina são o homogalacturonano (HGA) e os ramnogalacturonanos I (RG I) e II (RG II).

O HGA (figura 3 A), também chamado de ácido poligalacturônico, é um polissacarídeo linear constituído de resíduos de GalA α -1,4 ligados. A cadeia de homogalacturonano pode apresentar blocos metilesterificados (neutros) alternados a blocos não metilesterificados (negativos). Alguns resíduos dos homogalacturonanos podem se apresentar acetilados, mas isto não afeta a carga da molécula, apenas aumenta sua capacidade hidrofóbica (Dumville & Fry 2000). O grau de acetilação geralmente é menor que 10% e pode variar de acordo com o tecido ou estado celular (Van Cutsem & Messiaen 1994).

O RG-I (figura 3 B) possui resíduos de GalA α -1,4 ligados, intercalados por resíduos de ramnose ligados α -1,2. Alguns resíduos de GalA no RG-I podem ser acetilados. Os resíduos de ramnose podem formar ligações no carbono 2 com polissacarídeos neutros como arabinanos (figura 3 C), galactanos e arabinogalactanos tipo I (figura 3 D) e II (Dumville & Fry 2000).

O RG-II é considerado o polissacarídeo péctico mais complexo. Sua estrutura é rica em GalA α -1,4 ligado, mas contém ramificações laterais de açúcares, incluindo alguns raros, como ácido acérico e apiose (figura 3 E e F) (Dumville & Fry 2000).

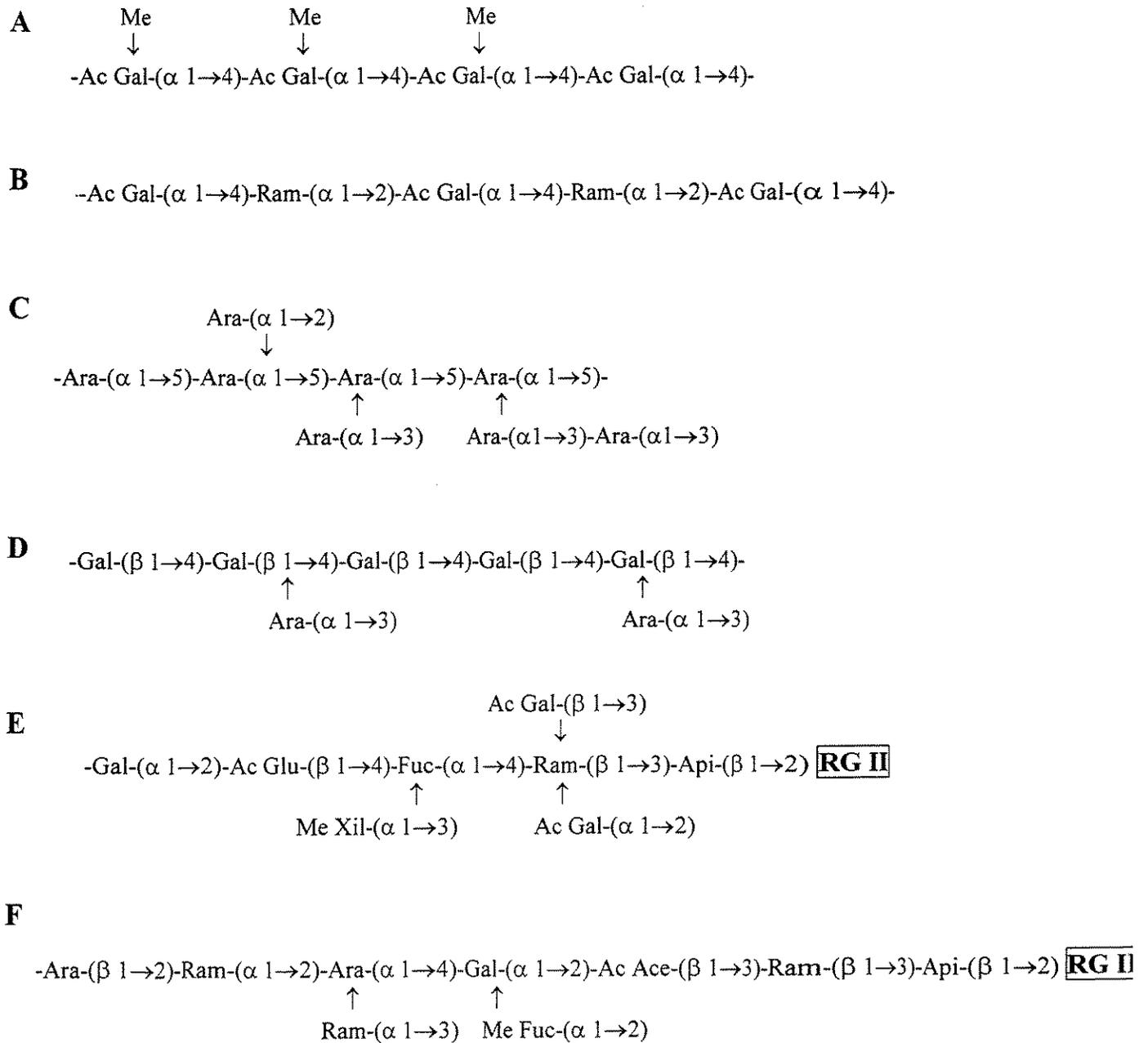


Figura 3. Polissacarídeos pécticos de plantas (segundo Carpita & Gibeaut, 1993 e Pérez *et al.* 2000). A: Homogalacturonano altamente metilesterificado. Me: grupo metil-éster. B: Cadeia principal do ramnogalacturonano-I. C: arabinano e D: arabinogalactano tipo I: dois tipos de ramificações ao RG-I que podem ser encontradas. E e F: heptassacarídeos presentes na estrutura do ramnogalacturonano-II. Ac Gal: ácido galacturônico; Ram: ramnose; Ara: arabinose; Gal: galactose; Ac Glu: ácido glucurônico; Fuc: fucose; Api: apiose; Xil: xilose; Ac Ace: ácido acérico.

A metilesterificação do HGA ocorre no sistema de endomembranas, anterior à sua deposição na parede celular. Quando secretadas na parede celular, as pectinas encontram-se altamente metilesterificadas. A ação de pectina-metilesterases (PMEs), presentes na própria planta, que catalisam a conversão do ácido poligalacturônico metilado em ácido galacturônico através da clivagem dos grupos metil-ésteres, possibilitam a ligação íons Ca^{2+} , levando à formação de estruturas conhecidas como caixas de ovos (“egg-box”) (figura 4). A variação do tamanho do poro em paredes celulares está relacionada ao grau de metilesterificação (GM) de suas pectinas. Mudanças no GM podem ocorrer durante o crescimento da parede celular; geralmente, os polissacarídeos pécnicos presentes em paredes jovens ou células crescendo ativamente são altamente metilesterificados, enquanto que paredes de células adultas contém pectinas ácidas (Liners & Van Cutsem 1992).

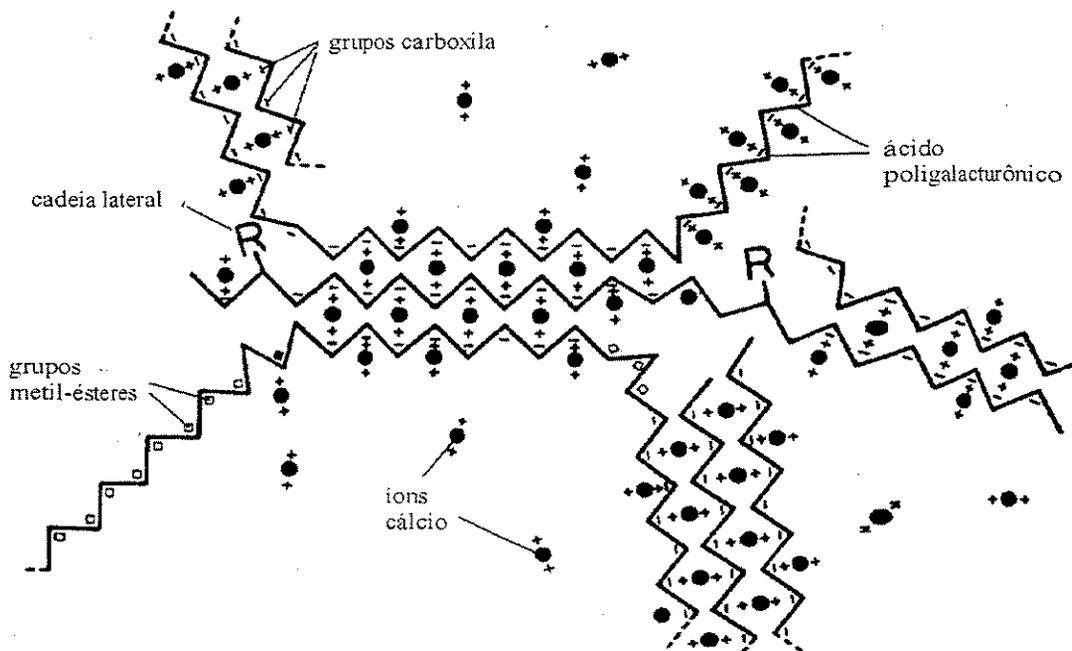


Figura 4. Interação entre cadeias antiparalelas do homogalacturonano (HGA) e os íons Ca^{2+} , nas regiões não metilesterificadas, para a formação da estrutura denominada caixa de ovo (Brett & Waldron 1990).

Os polissacarídeos pécticos podem ser estudados através de métodos bioquímicos, citoquímicos e imunoquímicos. Dentre os bioquímicos, destaca-se o uso de diversas pectinases, devido a sua composição variável. Os HGAs são alvos das endopoligalacturonases (Endo-PGs), exopoligalacturonases (Exo-PGs) e pectina-liases. Os RG I e II podem ser isolados após o tratamento com Endo-PGs (Whitcombe *et al.* 1995, Doco *et al.* 1997). Os métodos citoquímicos incluem coloração *in situ* específica para microscopia de luz (ML), utilizando, por exemplo, azul de toluidina, que cora radicais aniônicos totais. Em microscopia eletrônica de transmissão (MET), métodos imunoquímicos utilizam anticorpos monoclonais que reconhecem epítopos específicos dos polissacarídeos pécticos *in muro*. Dentre os anticorpos monoclonais conhecidos, que reconhecem pectinas com estruturas distintas destacam-se o JIM 5 (pectinas pouco metilesterificadas), JIM 7 (pectinas bastante metilesterificadas) e PAM 1 (30 resíduos contíguos de ácido galacturônico desesterificados no HGA) (Willats *et al.* 2000).

Devido a sua complexidade, várias funções são atribuídas às pectinas, como contribuir para a flexibilidade da parede celular, determinar a porosidade e o trânsito de macromoléculas, promover a adesão de células adjacentes, a hidratação e a plasticidade da parede celular durante o crescimento (Baron-Epel *et al.* 1988). Participam também da indução de respostas de defesa em plantas, pois contêm moléculas sinalizadoras como parte de sua estrutura (Darvill *et al.* 1992, Van Cutsem & Messiaen 1994).

Fitoalexinas

As plantas estão expostas, durante todo seu ciclo de vida, a microrganismos potencialmente patogênicos. Ao longo da evolução, elas passaram a reagir ao ataque destes microrganismos com uma grande variedade de mecanismos de defesa. Os microrganismos, por

outro lado, também co-evoluíram, refinando seus ataques através de toxinas e hidrolases específicas liberadas na interação com a planta hospedeira (Hutcheson, 1998).

A parede celular representa uma barreira natural ao ataque de microrganismos, pois é o primeiro obstáculo encontrado pelos patógenos, e que deve ser degradado para possibilitar a penetração e colonização dos tecidos da planta. Vários polímeros da parede celular servem como substrato para as numerosas enzimas secretadas pelos patógenos. Assim, durante a invasão por microrganismos, a parede celular sofre modificações na sua estrutura podendo participar ativamente da indução das respostas de defesa (Darvill *et al.* 1992, Esquerré-Tugayé *et al.* 2000), seja através de alterações em sua composição química, seja através da liberação de moléculas sinalizadoras. Compostos como calose, lignina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, além de hidrolases da parede celular e inibidores de enzimas fazem parte das defesas estruturais e químicas pré-formadas presentes na parede celular (Melotto & Labavitch 1994).

Dentre os diversos mecanismos de defesa, a síntese de fitoalexinas é considerada a principal resposta de resistência ao ataque de patógenos. Fitoalexinas são definidas como substâncias antimicrobianas, de baixo peso molecular, sintetizadas *de novo* pela planta e acumuladas nas células após a exposição a microrganismos (Paxton 1981). Devido à sua estrutura e rotas de biossíntese, a maioria das fitoalexinas pode ser considerada como produto do metabolismo secundário vegetal. Atualmente, mais de 300 estruturas têm sido caracterizadas como fitoalexinas, em experimentos relacionados a 900 espécies pertencentes a cerca de 40 famílias de angiospermas (Harborne 1999). Em monocotiledôneas, foram caracterizadas 46 fitoalexinas, dentre 17 espécies analisadas. As restantes foram identificadas em dicotiledôneas, em estudos com 24 famílias. Em gimnospermas, foram identificados 10 compostos, isolados de 7 espécies analisadas (Harborne 1999).

As fitoalexinas pertencem a diversas classes de metabólitos secundários, tais como flavonóides, isoflavonóides, diidrofenantrenos, estilbenos, cumarinas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, benzofuranos, furanoacetilenos, isocumarinas, pterocarpanos, poliacetilenos e polienos (Smith 1996). Os tipos de fitoalexinas produzidas, de um modo geral, acompanham o quimismo preponderante na família a qual pertence à planta de onde elas foram isoladas, possuindo estruturas semelhantes a outros metabólitos secundários acumulados na mesma espécie ou em espécies afins (Harborne 1999).

No Brasil, estudos relacionados à indução de fitoalexinas foram efetuados em dicotiledôneas nativas (Braga *et al.* 1986) e com espécies nativas da família Rubiaceae provenientes da mata e do cerrado (Braga *et al.* 1991, 1998, Braga & Dietrich 1998). Diversas rubiáceas produzem fitoalexinas quando inoculadas com esporos de fungos (Braga *et al.* 1986). A síntese desses metabólitos de defesa varia sazonalmente, estando completamente ausente nas épocas mais frias e secas do ano (Braga *et al.* 1991). Exceção foi observada para espécies de *Alibertia*, que não respondem com a produção de fitoalexinas em nenhuma época do ano, mesmo quando diferentes fungos foram utilizados como agentes indutores (Cordeiro Neto & Dietrich 1992). Nestes casos, as fitoalexinas possivelmente produzidas por estas espécies não foram quimicamente identificadas.

Diversas espécies de Rubiaceae produzem fitoalexinas em resposta a vários eliciadores. Alguns trabalhos mostram que em suspensões celulares de *Cinchona robusta*, *Galium mollugo* e *Rubia tinctorum* foram identificadas diversas fitoalexinas da classe das antraquinonas (Ramos-Valdivia *et al.* 1997, Schripsema *et al.* 1999, Van Tegelen *et al.* 1999).

Espécies de Leguminosae produzem fitoalexinas de natureza flavonoídica, as quais exibem elevada atividade antifúngica (Ingham 1982). Dentre elas, destacam-se plantas de soja, que são muito sensíveis a diferentes eliciadores obtidos de microrganismos, sendo as mais

utilizadas como planta-teste para bioensaio *in vitro* para a detecção da atividade indutora de fitoalexinas em microrganismos e em moléculas eliciadoras deles derivadas (Ayers *et al.* 1976). Neste, moléculas eliciadoras são aplicadas sobre uma área pré-definida no cotilédone de soja e a produção de fitoalexinas é acompanhada pela formação de coloração avermelhada (figura 5). As fitoalexinas produzidas pela soja pertencem à subclasse dos pterocarpanos complexos e são denominadas gliceolinas (Harborne 1999), tendo como principal precursor biossintético a daidzeína. As gliceolinas podem ser quantificadas por medidas espectrofotométricas a 286 nm e são facilmente identificadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

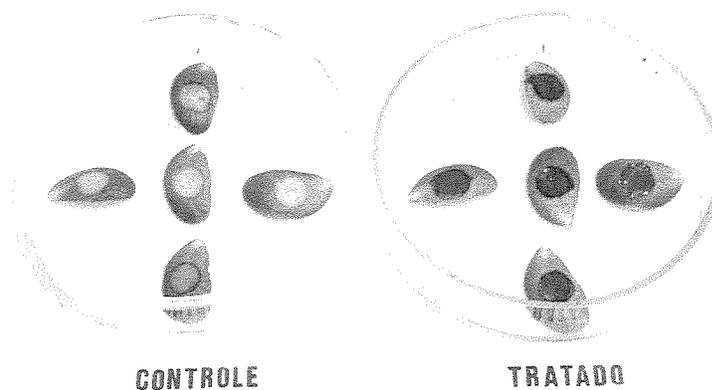


Figura 5. Bioensaio para a produção de fitoalexinas em soja. Controle: cotilédone tratado com água destilada; tratado: indução com o eliciador do fungo *Mucor ramosissimus*. A coloração escura presente nos cotilédones tratados é um indicativo da síntese de fitoalexinas.

Oligossacarinas e o mecanismo de liberação de oligogalacturonídeos

A indução de fitoalexinas requer o reconhecimento mútuo entre a planta e o microrganismo invasor, através da troca de sinais químicos. Tanto a parede celular vegetal quanto a parede celular do patógeno possuem moléculas que são liberadas durante esta interação. Estas

moléculas eliciadoras pertencem ao grupo das oligossacarinas, que atualmente são definidas como fragmentos de carboidratos de paredes celulares de plantas e fungos que possuem atividade biológica e que estimulam algum mecanismo de defesa na planta (Darvill *et al.* 1992).

Diversas oligossacarinas têm sido geradas *in vitro* através de hidrólise ácida e enzimática, e entre elas encontram-se aquelas derivadas de polissacarídeos de parede celular de fungos, como quitina e quitosano, e de polissacarídeos vegetais, como galactoglucomanos, xiloglucano e homogalacturonanos (Côté & Hahn 1994, Dumville & Fry 2000).

Nothnagel *et al.* (1983) descreveram as oligossacarinas indutoras de fitoalexinas derivadas da planta como fragmentos pécnicos da parede celular, sendo denominados oligogalacturonídeos ou eliciadores endógenos. Estes oligogalacturonídeos (figura 6) são formados por cerca de 98% de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, sendo o fragmento mais ativo identificado como um oligômero linear com grau de polimerização (GP) 12, embora fragmentos com GP entre 9 a 15 também mostrem atividade (Côté & Hahn 1994).

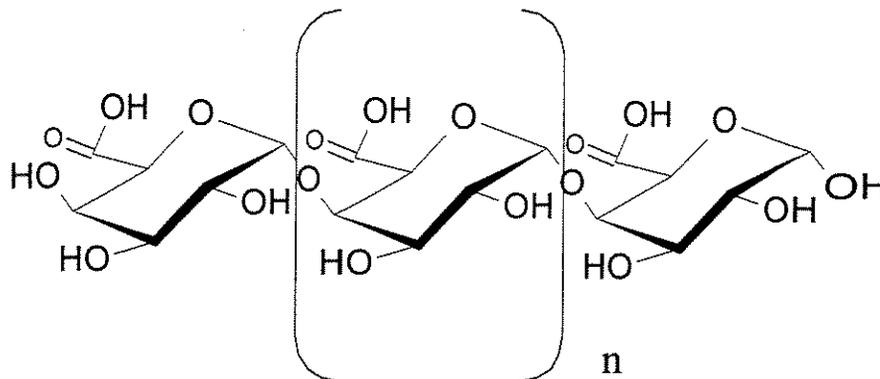


Figura 6. Estrutura do oligogalacturonídeo derivado do homogalacturonano (HGA) presente na fração pécica da parede celular de plantas. Para o fragmento mais ativo, n é igual a 10 (Smith 1996).

Diversas funções vêm sendo atribuídas aos oligogalacturonídeos, tais como a indução da síntese de lignina, de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, de inibidores de proteinases e da

síntese de fitoalexinas (Boudart *et al.* 1998). Para estarem envolvidos nestes processos, os oligogalacturonídeos devem ter um GP específico. Sua liberação ocorre devido à ação de enzimas produzidas por microrganismos invasores ou liberadas pela própria planta, que degradam os polissacarídeos pécticos. Dentre as enzimas secretadas por fungos, as pectinases são descritas como as mais importantes no processo de infecção, pois estão entre as primeiras polissacaridases a serem produzidas nos tecidos infectados (Fraissinet & Freve 1996). A ação destas pectinases fúngicas leva à despolimerização dos polissacarídeos pécticos, especialmente os HGA, gerando os oligômeros pécticos.

A atividade da Endo-PG, principal enzima relacionada à liberação de oligogalacturonídeos ativos, é diretamente influenciada pelo GM das pectinas. Muitos homogalacturonanos em plantas são metilesterificados em vários graus e a metilesterificação é conhecida por limitar a atividade da Endo-PG. A ação prévia da PME no polímero favorece a ação posterior da Endo-PG, aumentando sua atividade (Daas *et al.* 1999).

As plantas também podem modular a atividade das Endo-PGs de fungos através da ação de proteínas inibidoras de poligalacturonases (PIPGs), que limitam a atividade destas enzimas (Cervone *et al.* 1987). A formação do complexo Endo-PG - PIPG *in vitro* resulta numa alteração do balanço entre os oligogalacturonídeos ativos liberados e aqueles inativos resultantes da despolimerização dos oligogalacturonídeos maiores, favorecendo o acúmulo de moléculas com GP ao redor de 12, que possuem atividade indutora (Cervone *et al.* 1989, Glinka & Protsenko 1998).

Os mecanismos pelos quais os oligogalacturonídeos induzem respostas de defesa em plantas ainda não estão esclarecidos. Até o momento, não existem demonstrações claras da presença de receptores para estas moléculas em plantas. Como os oligogalacturonídeos são moléculas negativas, e por isso possuem pequena mobilidade, é pouco provável que atravessem a

membrana sem nenhum auxílio. Algumas evidências apontam para uma possível interação com a membrana plasmática (Aldington & Fry 1993).

Anatomia foliar de Rubiaceae

A família Rubiaceae é uma das famílias mais representativas da Mata Atlântica, com cerca de 10.700 espécies pertencentes a aproximadamente 637 gêneros, distribuídos principalmente nas regiões tropicais (Robbrecht 1988).

Poucos são os relatos em literatura a respeito de anatomia foliar de Rubiaceae. Accorsi (1947) caracterizou a ocorrência de células anexas dos estômatos como uma característica anatômica importante para esta família. Em microscopia de luz, destacam-se os trabalhos de anatomia foliar de Vieira (1986), que trabalhou com *Diodia radula*, Vieira *et al.* (1992), que analisaram *Psychotria nuda* e *P. leiocarpa*, Mantovani *et al.* (1995) que estudaram *Rudgea decipiens* e *R. macrophylla*, e Gomes *et al.* (2000) que analisaram a anatomia foliar de *Bathysa gymnocarpa*, *B. mendonçaei*, *B. cuspidata* e *B. australis*. Em microscopia eletrônica de varredura, Vieira & Gomes (1995) estudaram a superfície foliar de *Psychotria nuda*, *P. leiocarpa*, *P. stenocalyx* e *P. tenuinervis*.

Não foram encontrados relatos a respeito da anatomia foliar das espécies abordadas neste trabalho, *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*.

OBJETIVOS GERAIS

Considerando o reconhecido papel da parede celular na indução da síntese de fitoalexinas, especialmente dos fragmentos de origem pécica, e a escassez de dados sobre a indução de respostas de defesa em espécies nativas e sobre a anatomia foliar de espécies de Rubiaceae, o presente trabalho teve como objetivos:

- analisar o grau de metilesterificação de pectinas de folhas de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*, duas rubiáceas que diferem quanto à produção de fitoalexinas, através de tratamentos com enzimas fúngicas e imunolocalização com anticorpos monoclonais;
- correlacionar o grau de metilesterificação das pectinas dessas espécies com sua capacidade de liberar moléculas indutoras de fitoalexinas em cotilédones de soja;
- analisar e comparar, por microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão, a estrutura foliar de ambas espécies.

ARTIGO 1:

“Influência da metilesterificação de pectinas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae) na liberação e na atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em soja”, A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO*

* As normas utilizadas foram aquelas descritas para a Revista Brasileira de Botânica.

Influência da metilesterificação de pectinas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae) na liberação e na atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em soja

CLAUDIA ALVES DA SILVA¹ e MARCIA REGINA BRAGA^{2,3}

Título resumido: Metilesterificação de pectinas e a indução de fitoalexinas

-
1. Mestranda, Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, UNICAMP
 2. Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, C P 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.
 3. Autor para correspondência: bragamr@canalvip.com.br

ABSTRACT- (Influence of pectin methylesterification of *Alibertia myrcifolia* and *Rudgea jasminoides* in the liberation and activity of phytoalexin-inducing molecules in soybean). Two woody Rubiaceae species from tropical forest, *Alibertia myrcifolia* and *Rudgea jasminoides*, showed differences in relation to their capacity of producing phytoalexins when challenged with fungi and in the composition of the pectins from their cell walls. These species were compared in relation to the liberation and activity of phytoalexin-eliciting oligosaccharides derived from their leaf cell walls. Cell wall hydrolysis with Driselase showed that eliciting oligosaccharides could be released from both species, although they are more easily obtained from *R. jasminoides*, which presents positive phytoalexin response. High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD) showed that incubation of the cell walls with endopolygalacturonase promoted the liberation of oligosaccharides (degree of polymerization ≥ 7) from *R. jasminoides* but not from *A. myrcifolia* which shows negative phytoalexin response. Sequential hydrolyses with pectin-methylesterase and endopolygalacturonase that caused cell wall breakdown and releasing of oligosaccharides from *A. myrcifolia*, indicated the presence of pectins with different degree of methylesterification between the two species. Additionally, oligosaccharides with low degree of polymerization ($DP \leq 7$) derived from both species were shown to inhibit phytoalexin response induced by a fungal elicitor from *Mucor ramosissimus* or oligosaccharides with higher DP. These results suggest that the distinctive behavior between the Rubiaceae species in relation to their capacity of synthesis phytoalexin might be due to differences in the liberation of eliciting oligosaccharides from their cell walls as a consequence of the differences in the composition and degree of the methylesterification of their pectins.

RESUMO - (Influência da metilesterificação de pectinas de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* na liberação e atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em soja). Duas rubiáceas tropicais, *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*, que diferem com relação à capacidade de produzir fitoalexinas quando inoculadas com fungos e apresentam diferenças relacionadas à composição de carboidratos e ao teor e composição de pectinas foram comparadas em relação ao mecanismo de liberação e atividade de oligossacarídeos de parede celular indutores da síntese de fitoalexinas. Paredes celulares das espécies, tratadas com Driselase, por diferentes períodos, mostraram que esses oligossacarídeos estão presentes em ambas espécies, porém são mais facilmente liberados de *R. jasminoides*, espécie que apresenta resposta fitoalexínica. No tratamento das paredes celulares com endopoligalacturonase (Endo-PG), apenas *R. jasminoides* foi hidrolisada. Para *A. myrcifolia*, espécie que não produz fitoalexinas, ocorreu hidrólise somente após o tratamento prévio de sua parede com pectinametilesterase (PME), indicando a existência de diferenças no grau de metilesterificação (GM) das pectinas entre as espécies analisadas. Na análise em cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD), os hidrolisados de *R. jasminoides* com Endo-PG apresentaram oligossacarídeos com grau de polimerização (GP) ≥ 7 , fato não observado para *A. myrcifolia*. Após o tratamento com PME, ocorreu liberação de oligossacarídeos com GP ≤ 7 para ambas espécies, que estariam inibindo a síntese de fitoalexinas induzidas por oligogalacturonídeos maiores e pelo eliciador do fungo *Mucor ramosissimus*. Os resultados sugerem que a diferença no comportamento das duas rubiáceas com relação à sua capacidade de sintetizar fitoalexinas pode estar relacionada ao mecanismo de liberação de oligossacarídeos indutores, como consequência das diferenças no grau de metilesterificação e distribuição dos grupos metil-ésteres existentes nas frações pécticas de suas paredes celulares.

Key words - pectin, oligosaccharides, methylesterification, phytoalexin, Rubiaceae.

Introdução

Os polissacarídeos pécticos são os mais complexos e abundantes componentes da parede celular primária de plantas, sendo representados por moléculas ácidas e neutras. Os homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonano I (RG-I) e ramnogalacturonano II (RG-II) são moléculas ácidas, constituídas basicamente por uma cadeia de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, intercalados ou não por resíduos de ramnose. Os homogalacturonanos podem se apresentar metilesterificados em diferentes graus, sendo que, em presença de Ca^{2+} , as cadeias pécticas com baixo grau de metilesterificação se associam, formando um gel rígido e insolúvel, freqüentemente encontrado em paredes de células adultas, que cessaram seu crescimento (McNeil *et al.* 1984). O padrão de metilesterificação tem influência sobre as propriedades gelificantes das pectinas, além de limitar ou impedir a ação de pectinases sobre esses polímeros (Sakai *et al.* 1993).

Várias funções são atribuídas às pectinas, tais como determinar a porosidade da parede celular e controlar o trânsito de macromoléculas, promover a adesão entre células, conferir hidratação através da formação de géis, contribuir para plasticidade e flexibilidade da parede durante o crescimento e participar de mecanismos de defesa da planta ao ataque de patógenos (Darvill *et al.* 1992, Côté & Hahn 1994, McCann *et al.* 1994).

A penetração dos tecidos vegetais por patógenos e sua subsequente colonização envolvem freqüentemente a degradação de polissacarídeos da parede celular, através da liberação de várias hidrolases, estando as pectinases entre as primeiras polissacaridasas a serem produzidas nos tecidos infectados (Fraissinet-Tachet & Fevre 1996). A ação destas pectinases microbianas sobre

a parede celular de plantas, além de promover a maceração dos tecidos e a despolicimerização dos polissacarídeos pécticos, especialmente os homogalacturonanos, pode gerar fragmentos indutores, chamados oligogalacturonídeos. Esses fragmentos são capazes de eliciar respostas de defesa na própria planta, como a síntese *de novo* de metabólitos secundários antimicrobianos denominados fitoalexinas (Davis *et al.* 1984, Cervone *et al.* 1987). Os oligogalacturonídeos indutores da síntese de fitoalexinas são mais ativos quando possuem grau de polimerização (GP) ≥ 12 (Nothnagel *et al.* 1983), embora outras respostas de defesa como a síntese de lignina, de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e de inibidores de proteinases, também possam ser induzidas. Estas respostas dependem do GP dos oligossacarídeos gerados (Darvill *et al.* 1992).

Oligogalacturonídeos são liberados naturalmente pela ação de endopoligalacturonases (Endo-PGs) e pectina-liases de microrganismos (Alghisi & Favaron 1995, Cervone *et al.* 1989). *In vitro*, os oligogalacturonídeos podem ser gerados por hidrólise ácida parcial da parede celular (Hahn *et al.* 1981) ou por tratamento com pectinases (Nothnagel *et al.* 1983). A ação gradual da Endo-PG sobre a cadeia do homogalacturonano leva a um progressivo encurtamento da mesma, sendo seu limite de digestão representado por oligossacarídeos com GP=2-4.

A atividade da Endo-PG é diretamente influenciada pelo grau de metilesterificação (GM) das pectinas, que varia em diferentes tecidos e com o grau de diferenciação da célula (McNeil *et al.* 1984). Como os homogalacturonanos em plantas se apresentam metilesterificados em vários graus, a ação da pectinametilesterase (PME), pectinase que catalisa a conversão do ácido poligalacturônico metilado em ácido poligalacturônico através da clivagem dos grupos metil-ésteres (Alghisi & Favaron 1995), pode favorecer a ação posterior da Endo-PG, aumentando sua atividade (Daas *et al.* 1999).

Trabalhos recentes têm mostrado que as Endo-PGs necessitam de uma estrutura molecular básica e específica para a ancoragem, o reconhecimento e a clivagem do seu substrato. Mort & Chen (1996) relataram que a Endo-PG de *Erwinia carotovora* requer 4 resíduos de ácido galacturônico adjacentes não metilesterificados dentro de uma região parcialmente esterificada para exercer sua atividade catalítica. Daas *et al.* (1999) também demonstraram que a Endo-PG de *Kluyveromyces fragiles* necessita de um “bloco” com 4 ou mais seqüências de ácido galacturônico não esterificado para agir. Entretanto, há indícios que não somente o GM, mas a distribuição destes grupos metil-ésteres também seja importante para a ação da Endo-PG. Daas *et al.* (2000) demonstraram modos de ação e degradação diferentes para 3 pectinas com mesmo GM, mas com distribuição dos grupos metil-ésteres distinta, também considerando que a enzima necessita de 4 resíduos adjacentes não esterificados para atuar.

Vários trabalhos correlacionam a resistência das plantas a patógenos ao GM das pectinas. Heitefuss & Pagel (1989) e McMillan *et al.* (1993) trabalhando com batatas resistentes e suscetíveis à *E. carotovora*, correlacionaram, entre outros fatores, o GM com a resistência à bactéria. Le Cam *et al.* (1994) sugeriram que, além do GM, a distribuição dos grupos metil-ésteres estaria relacionada com a suscetibilidade de diversos cultivares de cenoura ao fungo *Mycocentrospora acerina*.

No Brasil, estudos relacionados à síntese de fitoalexinas em duas rubiáceas nativas tropicais, que diferem quando a capacidade de produzir esses metabólitos de defesa quando inoculadas com fungos, revelaram diferenças nas frações pécticas das paredes celulares de suas folhas (Braga *et al.* 1998). Foram detectados maiores teores de pectinas ácidas em *R. jasminoides*, espécie que produz fitoalexinas. A avaliação da presença de oligogalacturonídeos indutores de fitoalexinas nas paredes celulares dessas plantas também apontou para a presença de moléculas mais ativas em *R. jasminoides* (Braga & Dietrich 1998).

No presente trabalho são relatadas diferenças no GM das pectinas de paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*, que levam a diferenças na liberação e atividade de oligogalacturonídeos e que podem estar relacionadas às diferenças na resposta fitoalexínica observadas entre as duas espécies analisadas.

Material e métodos

Folhas completamente expandidas e sem lesões de *A. libertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. e de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. foram coletadas na mata da Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, do Instituto de Botânica de São Paulo-SP.

Sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] das cultivares IAC-8 e IAC-18 foram gentilmente cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, Campinas – SP.

Culturas do fungo *Mucor ramosissimus* Samutsevitch foram mantidas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por aproximadamente 8 dias no escuro a 25 °C, sendo seus esporos extraídos para a obtenção do eliciador utilizado no bioensaio dos cotilédones de soja, de acordo com metodologia descrita por Cordeiro Neto & Dietrich (1992).

Extração de paredes celulares - As paredes celulares foram extraídas a partir de 25 g de folhas frescas de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*, segundo procedimento descrito por Braga *et al.* (1998). As folhas foram previamente lavadas em água corrente, homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, em liquidificador, por 5 min, seguido de centrifugação (16000 g, 10 min). O sobrenadante foi descartado e o resíduo submetido ao mesmo procedimento por mais quatro vezes. O resíduo foi seqüencialmente extraído em água destilada, filtrado a vácuo em filtro de

fibra de vidro GF/A e re-extraído mais quatro vezes com clorofórmio: metanol (1:1 v/v) e lavado em acetona e éter etílico. Todas as etapas foram efetuadas a 5 °C. O resíduo final foi seco em estufa a 50 °C, moído manualmente com auxílio de almofariz e pistilo, sendo as fibras separadas em peneira tipo Granutest (malha 20) e o pó resultante considerado como a fração de parede celular.

Determinação do grau de metilesterificação das pectinas - Pectinas foram obtidas a partir das paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* por extração com oxalato de amônio 500 mM, pH 7,0, a 80 °C, por 1 h, conforme descrito por Braga *et al.* (1998). O GM foi calculado após saponificação das pectinas com NaOH 1,5 M a temperatura ambiente, acidificação a frio com H₂SO₄ e determinação do conteúdo de metanol liberado, segundo procedimento de Wood & Siddiqui (1971) e do conteúdo de ácidos urônicos (Fry 1988), segundo a fórmula:

$$\% \text{ de metilesterificação} = \frac{\mu\text{moles de metanol liberado}}{\mu\text{moles de ácido urônico}} \times 100$$

Hidrólise com Driselase - Vinte mg de paredes celulares obtidas das folhas foram incubadas com Driselase (Sigma), por 1, 2, 4, 6 e 8 h. A mistura de incubação continha, além das paredes celulares, 900 µL de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,7 e 100 µL da enzima, parcialmente purificada (Fry 1988). Os controles foram efetuados pela substituição da enzima por 100 µL de água destilada. Após incubação a 25 °C, a reação foi interrompida por fervura das misturas em água em ebulição por 5 min. Os hidrolisados foram centrifugados a 7800 g por 10 min, e os sobrenadantes filtrados em filtro de fibra de vidro para a eliminação de resíduos sólidos. O volume dos sobrenadantes foi completado para 1,0 mL com água destilada.

Hidrólise sequencial com pectina-metilesterase (PME) e endopoligalacturonase (Endo-PG) - A vinte mg de paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* foram adicionados 450 μ L de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,4 e 50 μ L (47 unidades de atividade - UA) da enzima pectina-metilesterase Sigma (PME). O controle foi efetuado pela substituição da enzima pelo volume equivalente em tampão. A incubação foi feita por 1 h em banho-maria a 30 °C. Os hidrolisados foram fervidos em água em ebulição por 5 min, centrifugados por 5 min e filtrados conforme acima mencionado, sendo os sobrenadantes mantidos a -20 °C. Os resíduos de paredes resultantes deste tratamento foram lavados três vezes com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e a eles foram acrescentados 300 μ L deste mesmo tampão, 150 μ L de água destilada e 50 μ L (5 UA) da enzima endopoligalacturonase Megazyme (Endo-PG). Nos controles, a enzima foi substituída por 50 μ L de água destilada. Após 8 h nas mesmas condições descritas acima, os hidrolisados foram novamente fervidos, centrifugados e o sobrenadante resultante foi filtrado, sendo seu volume ajustado para 1,0 mL com água destilada. Esses mesmos ensaios foram realizados tendo o tempo de incubação diminuído para 90, 60 e 30 min, e utilizando-se apenas 10 μ L de Endo-PG. Incubações de paredes com Endo-PG, sem o tratamento prévio com PME, também foram efetuadas.

Foram efetuadas também curvas de hidrólise das paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*, incubadas por 1h com PME e por 1, 2, 4, 6 e 8 h com 10 μ L de Endo-PG; tratamentos de paredes celulares foram efetuados variando-se o tempo de incubação com PME por 10, 20, 30 e 40 min, com tempo fixo de 4 h com Endo-PG.

Ensaio colorimétrico - As quantidades de açúcares totais e de açúcares redutores presentes nos hidrolisados foram determinadas pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et. al.* 1956) e de Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), respectivamente, tendo glucose (100 μ g/mL) como padrão. O

conteúdo de ácidos urônicos foi determinado utilizando-se o método de *m*-hidroxibifenil, e tendo ácido galacturônico (100 µg/mL) como padrão (Fry 1988, Filisetti-Cozzi & Carpita 1991).

Análise dos hidrolisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) - Os hidrolisados obtidos por ação da Driselase e de PME e Endo-PG foram analisados por HPAEC em sistema Dionex DX-300 e DX-500, com detector de pulso amperométrico (PAD) para monossacarídeos e oligossacarídeos de ácidos urônicos (oligogalacturonídeos). Os monossacarídeos foram separados em coluna Carbo-Pac PA-1 em NaOH 20 mM isocrático por 30 min e identificados por comparação com padrões comerciais. Os oligogalacturonídeos foram analisados conforme descrito por Spiro *et. al* (1993), em coluna Carbo-Pac PA-1 no sistema DX-300 utilizando como eluente um gradiente linear de 400-800 mM de acetato de sódio, pH 8,0, a um fluxo de 1mL.min⁻¹, durante 40 min. Foi utilizada pós-coluna com NaOH 400mM a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A coluna foi re-equilibrada com 400mM de acetato de sódio por 10 min antes da aplicação de uma nova amostra. Os tempos de eluição foram comparados com aqueles obtidos para padrões de oligogalacturonídeos GP 3-5 fornecidos pelo Dr. Stephen C. Fry (University of Edinburgh- Escócia). As análises no sistema Dionex DX-500 também foram efetuadas em coluna Carbo-Pac PA-1, utilizando-se um gradiente linear de acetato de sódio de 400-800 mM em 100 mM de hidróxido de sódio, por 60 min. Os tempos de eluição foram comparados com aqueles obtidos para padrão de oligogalacturonídeos GP 7-22 fornecidos pelo Dr. Stephan Eberhard (University of Georgia-EUA).

Bioensaio de atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja - A detecção da atividade indutora de fitoalexinas nos hidrolisados de paredes celulares foi efetuada segundo procedimento descrito por Ayers *et al.* (1976), modificado. Os cotilédones de soja foram obtidos a partir de

sementes germinadas e cultivadas em casa de vegetação, em bandejas plásticas contendo vermiculita:terra vegetal (2:1), na forma de camadas, em temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (14 horas luz/dia), por aproximadamente 8-11 dias. Os cotilédones destacados foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10%, durante 15 min e lavados exaustivamente em água destilada estéril. Discos de 6 mm de diâmetro e cerca de 1 mm de espessura foram retirados da superfície adaxial de cada cotilédone com o auxílio de um furador de rolhas e um bisturi. Gotas de 50 µL dos hidrolisados resultantes dos tratamentos enzimáticos, de água destilada (controle) e do eliciador obtido de esporos de *Mucor ramosissimus* (preparado segundo Cordeiro Neto & Dietrich 1992) foram aplicadas sobre a superfície cortada de cada cotilédone. Grupos de 5 cotilédones foram colocados em placas de Petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada, e estes incubados no escuro a 26 °C, por 20 h. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata. Após a incubação, os cotilédones foram lavados com água destilada (1 mL/cotilédone) e as soluções resultantes filtradas e avaliadas quanto à presença de fitoalexinas (gliceolinas) por leitura em espectrofotômetro a 286 nm. A quantificação de gliceolinas foi efetuada utilizando-se padrão de gliceolina isolado de cotilédones de soja (Ayers *et al.* 1976).

Ensaio de competição entre oligossacarídeos indutores – Hidrolisados provenientes da incubação de paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* com Endo-PG por 4 e 6 h foram diluídos a 50% com água destilada ou com hidrolisados de paredes de *R. jasminoides*, obtidos por tratamento com PME por 1h e com Endo-PG por 4 ou 6 h. Além disso, o eliciador do fungo *M. ramosissimus* foi também diluído a 75, 50 e 25% com água destilada e com os hidrolisados de paredes de *A. myrcifolia* provenientes do tratamento por 40 min com PME e 4 h com Endo-PG e de *R. jasminoides* tratadas por 1h com PME e 4 h Endo-PG. Essas diluições foram ensaiadas em

cotilédones de soja para a avaliação da atividade indutora, conforme descrito acima. Os controles foram efetuados utilizando-se água destilada, os hidrolisados e o eliciador a 100%.

Análise estatística – As médias das determinações colorimétricas e de atividade indutora foram comparadas pelo teste estatístico de Tukey usando o programa de microcomputador SANEST, cedido pelo Dr. Ladaslav Sodek (UNICAMP/SP).

Resultados e Discussão

A parede celular vegetal possui composição química complexa, o que dificulta, mas não impede sua degradação por patógenos (Hahn *et al.* 1989). Ao longo da evolução, os fungos desenvolveram um arsenal de enzimas capazes de degradar os tecidos vegetais, de modo a possibilitar seu acesso ao interior da célula vegetal. Neste trabalho, Driselase foi escolhida por ser composta de uma mistura de 14 enzimas diferentes liberadas pelo fungo *Irpex lacteus*, capazes de hidrolisar a parede celular vegetal e, desta maneira, simular alguns dos eventos que ocorrem na infecção por patógenos, podendo levar à conseqüente liberação de oligogalacturonídeos indutores de fitoalexinas.

Pela figura 1 A, nota-se que a incubação da parede celular de *A. myrcifolia* com Driselase ocasionou a liberação de carboidratos, sendo que os açúcares redutores e os ácidos urônicos representam apenas parte do total liberado. O aumento nos teores de açúcares foi observado apenas entre 1 e 2 h de incubação, não ocorrendo variações significativas com o aumento do tempo de hidrólise. Para *R. jasminoides* (figura 1 B), a liberação de açúcares foi crescente a partir de 1 h de incubação com Driselase, indicando aumento na porcentagem de hidrólise da parede com o aumento do tempo de ensaio.

Comparando-se as figuras 1 A e B, observa-se que a cinética de liberação de carboidratos a partir das paredes celulares das duas espécies é bastante distinta, indicando diferenças na labilidade à hidrólise promovida por enzimas fúngicas. *R. jasminoides* liberou quase quatro vezes mais carboidratos que *A. myrcifolia*, confirmando os resultados obtidos por Braga & Dietrich (1998), que sugeriram a existência de diferenças na estrutura dos polissacarídeos das paredes celulares entre as espécies.

A atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja também foi diferente para os hidrolisados das duas espécies analisadas (figura 1 C e D). Para *A. myrcifolia*, a atividade indutora mostrou aumento progressivo a partir de 1 h de incubação (figura 1 C), porém foi bastante inferior àquela detectada para *R. jasminoides*. Para esta espécie, o aumento da atividade indutora foi observado até 4 h, sendo esta completamente abolida a partir de 6 h de incubação (figura 1 D).

Comparando estes resultados com os teores de carboidratos apresentados nas figuras 1 A e B, nota-se, para *A. myrcifolia*, que o aumento da atividade indutora parece ser consequência da quebra de moléculas maiores já presentes em solução, uma vez que não ocorreu aumento significativo na liberação de açúcares da parede celular com o aumento do tempo de incubação. Conforme demonstrado para moléculas indutoras extraídas de fungos, fragmentos de diversos tamanhos são ativos em soja, por conter a unidade mínima indutora dentro de sua estrutura (Nothnagel *et al.* 1983, Sharp *et al.* 1984). Para *R. jasminoides*, o aumento da atividade até 4 h de incubação coincidiu com o aumento do conteúdo de carboidratos, indicando hidrólise progressiva da parede celular. A partir de 6 h de incubação, apesar de observado aumento na quantidade de açúcares liberados (figura 1 B), a atividade indutora foi abolida, sugerindo que, neste caso, as moléculas maiores ativas devem ter sido hidrolisadas a fragmentos menores, que perderam a estrutura mínima requerida para a indução.

A análise por HPAEC/PAD dos hidrolisados de paredes celulares tratadas com Driselase revelou que os açúcares redutores liberados são representados predominantemente por glucose e arabinose para *A. myrcifolia*, e glucose, galactose e arabinose para *R. jasminoides* (figura 2). O aumento do tempo de incubação de 4 para 8 h promoveu maior degradação da fração pécica, representada pelo aumento nos teores de arabinose e galactose em ambas espécies. Para *R. jasminoides*, a hidrólise por 8 h também resultou na liberação de ramnose (figura 2 E), indicando que com maior tempo de incubação, o ramnogalacturonano I (RG-I) também passa a ser degradado, fato não observado para *A. myrcifolia*. Esse resultado está de acordo com os dados de Braga *et al.* (1998), que apontaram para diferenças no teor e composição dos polissacarídeos pécicos entre as duas rubiáceas analisadas. A presença de ramnose nos hidrolisados de *R. jasminoides* é um indício da ação de Endo-PG sobre a fração pécica da parede celular, liberando RG-I e tornando-o suscetível a ação de outras hidrolases. Conforme reportado por McNeil *et al.* (1980), Ishii *et al.* (1989) e Zablackis *et al.* (1995), Endo-PGs têm sido utilizadas para o isolamento de RG-I a partir de paredes celulares de diversas espécies vegetais, por hidrolisar homogalacturonanos pouco metilesterificados.

Oligogalacturonídeos de GP ≥ 12 , ou seja, aqueles descritos por Nothnagel *et al.* (1983) como ativos na indução de fitoalexinas em soja, não foram encontrados nos hidrolisados resultantes do tratamento das paredes celulares com Driselase (figura 3). Entretanto, conforme salientado por esses autores, a presença de pequenas quantidades de moléculas ativas, mesmo não detectáveis por análises cromatográficas, pode ser suficiente para determinar a indução da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja. As análises por HPAEC/PAD revelaram oligogalacturonídeos de pequeno GP detectados a partir de 1 h de incubação (figura 3 E, F), havendo, em ambos os casos, aumento dessas moléculas com o tempo de hidrólise (figura 3 G-J).

Para *R. jasminoides*, o aumento na proporção desses fragmentos de pequeno GP com o aumento do tempo de incubação parece indicar que a perda da atividade indutora a partir de 6 h (figura 1 D) foi devida a quebra dos fragmentos maiores, que são ativos, em fragmentos menores, inativos, conforme anteriormente sugerido. Oligogalacturonídeos não foram encontrados em qualquer dos controles incubados na ausência da enzima, sendo os perfis desses hidrolisados idênticos aos mostrados na figura 3 C e D.

Braga & Dietrich (1998) observaram que paredes celulares de *R. jasminoides* incubadas por 18 h com Endo-PG eram mais facilmente hidrolisadas quando comparadas às de *A. myrcifolia*. Foi sugerido que essa diferença poderia ser devida à presença de resíduos de ácido galacturônico da pectina bastante substituídos por grupos metil-ésteres em *A. myrcifolia*, o que limitaria a ação da Endo-PG. A análise de monossacarídeos mostrada na figura 2 reforça essa sugestão.

A determinação do grau de metilesterificação das pectinas das paredes celulares através de métodos colorimétricos mostrou que, em *R. jasminoides*, cerca de 30% de sua pectina encontra-se substituída por grupos metil-ésteres. Para *A. myrcifolia*, o valor encontrado foi de 133%, o que indica a existência de outros compostos metilesterificados, além dos ácidos urônicos presentes na fração pectínica. Entre eles, encontram-se os compostos fenólicos, que são substâncias normalmente presentes na parede celular de folhas e que ocorrem em grande quantidade nesta espécie (Braga *et al.* 1991). Desse modo, por métodos colorimétricos não foi possível a determinação exata do GM para *A. myrcifolia* e a confirmação da sugestão da existência de diferenças no GM para as duas espécies analisadas.

No ensaio mostrado na tabela 1, paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* foram incubadas diretamente com Endo-PG ou pré-tratadas com PME por 1 h antes da hidrólise com Endo-PG por 8 h. Pequena hidrólise das paredes celulares de *A. myrcifolia* com Endo-PG foi

observada em comparação à *R. jasminoides*, confirmando os resultados de Braga & Dietrich (1998). O tratamento prévio da parede celular de *A. myrcifolia* com PME resultou em um aumento de cerca de 3 vezes no teor de ácidos urônicos liberados quando comparado à hidrólise somente com Endo-PG, confirmando a presença de grupos metil-ésteres limitando a ação dessa enzima. Entretanto, a quantidade de ácidos urônicos liberada ainda foi bastante inferior à de *R. jasminoides* (4,9 vezes menor), sugerindo que não apenas o GM, mas outras características da parede celular de *A. myrcifolia* devem contribuir para esses resultados. Braga *et al.* (1998) demonstraram que a quantidade de ácidos urônicos encontrada nas pectinas de *A. myrcifolia* é cerca de 4,6 vezes menor do que a de *R. jasminoides*, confirmando os dados obtidos na tabela 1. Por essa razão, mesmo eliminando-se toda a metilesterificação dos homogalacturonanos da parede celular de *A. myrcifolia* através do tratamento prévio com PME, a quantidade de polissacarídeos ácidos disponíveis para a ação da Endo-PG foi menor, o que explica a menor quantidade de ácidos urônicos liberada pela hidrólise das paredes celulares desta espécie. Para *R. jasminoides*, cuja parede celular é facilmente hidrolisada pela Endo-PG, a incubação prévia com PME promoveu um pequeno aumento na hidrólise subsequente com a Endo-PG, indicando que o GM de sua pectina é bastante inferior ao de *A. myrcifolia*.

A análise por HPAEC/PAD dos hidrolisados obtidos pela incubação com PME por 1 h e com Endo-PG por 8 h revelou que oligogalacturonídeos somente são liberados de paredes de *A. myrcifolia* após o tratamento prévio com PME, e que estes possuem pequeno GP (dados não mostrados). De acordo com Nothnagel *et al.* (1983), oligogalacturonídeos com GP ≥ 12 são os que apresentam maior atividade indutora da síntese de fitoalexinas. Por isso, possivelmente os oligogalacturonídeos obtidos pela incubação com PME/Endo-PG, aplicados em soja, não apresentaram a capacidade de induzir a síntese de fitoalexinas nos cotilédones desta planta (dados

não mostrados). A detecção de oligogalacturonídeos de pequeno GP nos hidrolisados de paredes celulares indicou que o tempo de hidrólise com Endo-PG foi excessivo, havendo necessidade de redução do mesmo para a obtenção de fragmentos ativos.

O tempo de hidrólise das paredes celulares de ambas espécies foi reduzido de 8 h para 90, 60 e 30 min de incubação com Endo-PG, sendo mantido o tempo de 1 h no pré-tratamento com PME. As incubações com 30 min não geraram oligogalacturonídeos em quantidades que pudessem ser detectados por HPAEC/PAD (resultados não mostrados). Como os perfis de eluição das incubações com 60 e 90 min foram semelhantes, somente o perfil de 90 min de incubação é mostrado na figura 4. Para *R. jasminoides* (figura 4 F), o tratamento apenas com Endo-PG resultou na liberação de oligogalacturonídeos de diferentes GP, incluindo aqueles de GP igual ou superior a 12 e que sabidamente são moléculas com atividade indutora de fitoalexinas. Nenhum oligogalacturonídeo foi detectado para *A. myrcifolia* (figura 4 E) no mesmo tipo de tratamento. Para esta espécie, apenas a incubação sequencial com PME e Endo-PG resultou na liberação de oligogalacturonídeos (figura 4 G), o que comprova a elevada metilesterificação de sua pectina, conforme anteriormente sugerido.

Apesar de oligogalacturonídeos de $GP \geq 12$ terem sido detectados por HPAEC/PAD, principalmente para *R. jasminoides*, novamente foi observada a ausência de resposta indutora dos hidrolisados, no ensaio com cotilédones de soja (tabela 2), indicando que o tempo de incubação ideal para gerar atividade indutora não tinha sido estabelecido. Assim, o tempo de incubação com PME foi mantido em 1 h e variou-se o tempo de hidrólise com Endo-PG.

Paredes celulares de *A. myrcifolia* hidrolisadas com Endo-PG por 1 a 8 h mostraram pequena liberação de ácidos urônicos, confirmando os dados anteriormente obtidos (figura 5 A). Porém, o tratamento prévio com PME ocasionou aumento no teor de ácidos urônicos liberados a

partir de 2 horas de incubação. Para *R. jasminoides* (figura 5 B), o tratamento com Endo-PG resultou em uma liberação quatro vezes maior de ácidos urônicos do que o observado para *A. myrcifolia*. Entretanto, a incubação prévia com PME determinou menor liberação de ácidos urônicos a partir da parede celular dessa espécie, divergindo dos resultados mostrados na tabela 1.

No ensaio dos incubados da curva de hidrólise em cotilédones de soja não foi detectada atividade indutora de fitoalexinas em nenhum dos hidrolisados de *A. myrcifolia* (figura 5 C) e no hidrolisados de *R. jasminoides* tratados previamente com PME (figura 5 D), sendo a atividade indutora presente somente nos incubados de *R. jasminoides* com Endo-PG até 6 h de incubação.

A análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD mostrou que o padrão observado não variou para cada espécie no decorrer do tempo de incubação. Por esta razão, na figura 6 são apresentados alguns perfis cromatográficos representativos, sendo os controles relativos à incubação das paredes celulares com tampão por 8 h (figura 6 A, B) e os hidrolisados, relativos às incubações das paredes celulares com Endo-PG por 8 h (figura 6 C, D). Para *R. jasminoides*, na incubação com Endo-PG (figura 6 D) e com PME+Endo-PG (F, H, J) foram detectados oligogalacturonídeos com $GP \geq 7$ em todos os tempos de incubação. Para *A. myrcifolia*, oligogalacturonídeos de pequeno GP foram detectados a partir de 1 h de incubação com PME+Endo-PG (E, G, I), mas, mesmo assim, em menores quantidades que aqueles encontrados para *R. jasminoides*.

Estes resultados sugerem que algum fator, para *R. jasminoides*, após o tratamento com a PME, estaria reduzindo a ação da Endo-PG na clivagem da pectina, uma vez que houve diminuição na porcentagem de hidrólise, como mostrado na figura 5 B. Mort & Chen (1996) e Daas *et al.* (1999) relataram que a Endo-PGs fúngicas necessitam, usualmente, de uma estrutura

composta por quatro resíduos de ácido galacturônico não esterificados numa região parcialmente esterificada para poder agir. No caso de *R. jasminoides*, o tratamento prévio com PME poderia alterar a estrutura molecular reconhecida pela Endo-PG, explicando assim a diminuição na porcentagem de hidrólise para esta espécie. Como um novo lote de PME comercial foi utilizado neste ensaio, é possível explicar esse decréscimo no conteúdo de ácidos urônicos pela eliminação excessiva de grupos metil-ésteres, sendo necessário reduzir a retirada de metilesterificação da pectina através da diminuição do tempo de hidrólise com a PME.

Através da figura 7, onde paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* foram tratadas com PME por 10 a 40 min e com Endo-PG por 4 h, pode-se observar que a quantidade de ácidos urônicos liberada para *A. myrcifolia* no tratamento com Endo-PG ainda é bastante inferior quando comparada a *R. jasminoides* e o tratamento prévio com PME promoveu um aumento nesta hidrólise, porém não mostrando variações significativas com o aumento do tempo de incubação (figura 7 A). Para *R. jasminoides*, o tratamento prévio com PME ocasionou maior liberação de ácidos urônicos entre 10 e 20 min de incubação, ocorrendo redução a partir desse período (figura 7 B).

A aplicação dos hidrolisados sobre cotilédones de soja mostrou que, para *A. myrcifolia* (figura 7 C) nenhum deles apresentou resposta indutora de fitoalexinas significativa quando comparados ao controle. Apesar da incubação prévia com PME ter ocasionado um aumento na quantidade de ácidos urônicos liberados, não foram liberados oligogalacturonídeos ativos em soja. Para *R. jasminoides* (figura 7 D), os hidrolisados provenientes do tratamento com Endo-PG apresentaram atividade indutora, como visto anteriormente (figura 5 D). Os hidrolisados pré-tratados com PME mostraram atividade significativa entre 20 e 30 min de incubação com PME, confirmando a sugestão anterior de que o tempo de hidrólise por 1 h foi excessivo. Entretanto, esta atividade ainda foi inferior à atividade do incubado somente com Endo-PG.

A análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD foi realizada em todos os tratamentos, porém somente alguns perfis cromatográficos representativos são mostrados nas figuras 8 e 9. Nos perfis cromatográficos das incubações de paredes apenas com tampão, referentes a 40 min de incubação com PME (figuras 8 B e 9 B), nenhum oligogalacturonídeo foi detectado. Para *R. jasminoides*, no tratamento com Endo-PG, ocorreu liberação de oligogalacturonídeos com diferentes GP, inclusive os com $GP \geq 9$, porém a quantidade e o GP não variaram significativamente nos tratamentos (figura 9 C, E). Estes oligogalacturonídeos não foram observados para *A. myrcifolia* no mesmo tratamento (figura 8 C, E). No hidrolisado previamente tratado com PME, para *R. jasminoides*, foram encontrados os mesmos oligogalacturonídeos vistos no tratamento com Endo-PG, sendo observado para 10 min oligogalacturonídeos em maior quantidade e GP (figura 9 D). Parece que, com o aumento o tempo de incubação com PME, ocorre diminuição na proporção de oligogalacturonídeos de maior GP. Nos hidrolisados de *A. myrcifolia* com PME não foram detectados oligogalacturonídeos, estando este resultado de acordo com a ausência da atividade indutora mostrada na figura 7 C.

Assim, embora inicialmente tivesse sido sugerido excesso de hidrólise por incubação de paredes celulares de *A. myrcifolia* com PME por 1 h, parece que este é o melhor tempo de hidrólise para que ocorra liberação de oligogalacturonídeos por ação da Endo-PG, embora não sejam obtidos oligogalacturonídeos ativos (figura 6). Estes resultados sugerem que, para *A. myrcifolia*, mesmo variando-se o tempo de incubação com PME, não ocorre liberação de oligogalacturonídeos ativos pela ação da Endo-PG. A estrutura molecular da pectina desta espécie parece ser muito complexa, de forma a impedir a ação de pectinases importantes no processo de eliciação, sendo provavelmente também um dos fatores da ausência de resposta fitoalexínica para esta espécie. Entretanto, para *R. jasminoides*, esses dados indicam que até 30

min de incubação com PME, a estrutura da pectina, proporcionada pela ação da PME, parece ser a ideal para o reconhecimento e clivagem pela Endo-PG, com conseqüente liberação de fragmentos ativos em soja. A partir de 30 min de incubação, provavelmente a PME retira grupos metil-ésteres importantes para o reconhecimento pela Endo-PG, como sugerem Mort & Chen (1996) e Daas *et al.* (1999), confirmando assim o excesso de tempo de hidrólise por 1 h com PME para esta espécie.

Por outro lado, ainda é possível supor que exista algum fator, presente nos hidrolisados pré-tratados com PME, que estaria inibindo a síntese de fitoalexinas em ambas espécies, e principalmente para *R. jasminoides*, uma vez que a análise de seus hidrolisados pré-tratados com PME, por HPAEC/PAD, mostrou a presença de oligogalacturonídeos ativos (com GP \geq 12), porém a atividade indutora apresentada por estes hidrolisados sempre foi inferior quando comparada àquela observada para os hidrolisados obtidos pelo tratamento com Endo-PG (figuras 6 e 9). Moerschbacher *et al.* (1999) relataram que, em folhas de trigo, oligômeros de ácido galacturônico de baixo GP atuam como supressores endógenos de reações de resistência. Dentre os oligogalacturonídeos testados, de monômeros a hexâmeros, os dímeros e trímeros se mostraram mais ativos, inclusive quando aplicados concomitantemente ao eliciador, um glicoproteogalactano, isolado do fungo *Puccinia graminis*, suprimindo sua atividade.

Pela tabela 3, pode-se observar que os hidrolisados de *R. jasminoides* com Endo-PG por 4 e 6 h de incubação apresentaram atividade indutora de fitoalexinas, e que esta atividade foi pouco diminuída pela diluição a 50% com água destilada. Porém, quando ao hidrolisado Endo-PG foi adicionado o hidrolisado resultante da incubação com PME+Endo-PG, essa atividade foi completamente abolida. Também o eliciador de *M. ramosissimus*, quando diluído no mesmo hidrolisado (PME+Endo-PG), apresentou queda significativa na atividade indutora, fato não

observado na diluição com água. Para *A. myrcifolia*, o hidrolisado PME+Endo-PG também ocasionou queda na atividade indutora do eliciador. Portanto, não existiu efeito de diluição, mas de algum fator presente nos hidrolisados de ambas espécies, após o tratamento prévio com PME, que ocasionou a queda na atividade indutora. Essa interferência ocorreu inclusive reduzindo a produção de fitoalexinas ocasionada pela injúria dos cotilédones, e que é medida pelo controle e que por si só é suficiente para desencadear a resposta de defesa em pequena escala. Assim, é provável que os oligogalacturonídeos de pequeno GP gerados nos hidrolisados de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* estejam inibindo a atividade dos oligogalacturonídeos maiores, uma vez que também diminuíram a atividade do eliciador de *M. ramosissimus*, que é um β -glucano, quando este foi ensaiado em soja misturado nestes hidrolisados. Esses resultados explicam a ausência de atividade indutora nos hidrolisados de *R. jasminoides* incubados com Driselase por 6-8 h (figura 1 B e D), indicando que a perda de atividade pode ser atribuída não somente à quebra de fragmentos ativos já presentes no meio de incubação, mas também a um aumento de oligogalacturonídeos de pequeno GP que inibem a indução.

Outro ensaio de inibição, realizado somente com o eliciador de *M. ramosissimus*, é mostrado na figura 10. A aplicação do eliciador diluído em água destilada nas proporções entre 25 a 75% não alterou o padrão de sua atividade indutora de fitoalexinas. Entretanto, quando este foi aplicado nas mesmas proporções de diluição juntamente com os hidrolisados das paredes celulares de ambas espécies resultantes do tratamento combinado com PME seguida de Endo-PG, ocorreu inibição da atividade indutora. Essa inibição parece não ser por competição, uma vez que tanto oligogalacturonídeos derivados de plantas como β -glucanos oriundos de fungos, que possuem receptores distintos em nível de membrana celular, têm sua atividade suprimida.

Esses resultados sugerem que a ação da PME sobre as pectinas das paredes celulares de ambas espécies pode regular a liberação de oligogalacturonídeos de diferentes GP. Assim, considerando-se que: a) a ação da PME sobre a molécula influencia a especificidade posterior da Endo-PG; b) as pectinas apresentam diferentes GM e distribuição destes grupos metil-ésteres (Le Cam *et al.* 1994) e c) a Endo-PG atua diferentemente sobre cada substrato, dependendo da distribuição dos grupos metil-ésteres (Daas *et al.* 2000), resultando em diferenças na liberação de fragmentos maiores ou menores, é possível supor que a distribuição dos grupos metil-ésteres na pectina seja de extrema importância no processo de liberação de oligogalacturonídeos ativos, requeridos no processo de indução de fitoalexinas. Além disso, podem contribuir para a resposta final de defesa a proporção relativa entre os fragmentos de diferentes GP gerados durante a maceração dos tecidos.

Esta relação entre os fragmentos menores e maiores provavelmente determina uma regulação fina do processo de eliciação, ainda não bem compreendida. Assim, fragmentos ativos liberados durante o processo de infecção ocasionariam a ativação do sistema de defesa da planta. Com o decorrer do processo, fragmentos menores, inativos, gerados pela degradação excessiva das pectinas ou dos fragmentos maiores, poderiam suprimir a indução por se apresentarem em maior proporção, conseqüentemente desligando o sistema de defesa da planta.

Le Cam *et al.* (1994) observaram que o grau de suscetibilidade de cultivares de cenoura ao ataque do fungo *Mycocentrospora acerina* está relacionado ao GM das pectinas que compõem as paredes celulares. No presente trabalho, a utilização de enzimas hidrolíticas de parede celular demonstrou a existência de diferenças na suscetibilidade de paredes de rubiáceas ao ataque destas enzimas. A ausência de hidrólise de paredes celulares de *A. myrcifolia* com Endo-PG parece estar relacionada ao alto GM de sua fração pectica. A utilização de Driselase demonstrou que fragmentos ativos são liberados a partir da parede de *A. myrcifolia*, porém com a necessidade de

um tempo de incubação maior do que aquele requerido para paredes de *R. jasminoides*. Isto provavelmente decorre da necessidade de que outras hidrolases presentes na Driselase (por exemplo, PME) atuem previamente sobre a parede de *A. myrcifolia*, de maneira a permitir a ação posterior da Endo-PG sobre a mesma. Para *R. jasminoides*, moléculas ativas são liberadas de sua parede celular, porém a distribuição dos grupos metil-ésteres anterior e posteriormente à ação da PME também são fatores limitantes para a ação da Endo-PG e conseqüentemente para a liberação de oligogalacturonídeos ativos. É possível sugerir que oligogalacturonídeos de pequeno GP possam atuar como supressores endógenos da síntese de fitoalexinas, conforme relatado por Moerschbacher *et al.* (1999) para plantas de trigo, onde foi observada supressão da resposta de resistência ao fungo causador da ferrugem. Todos estes fatores podem interferir com a capacidade de resposta fitoalexínica destas espécies quando em contato com microrganismos potencialmente patogênicos.

Os ensaios de indução de fitoalexinas utilizando os hidrolisados das paredes celulares sobre as próprias folhas das espécies em estudo, embora efetuados (dados não mostrados), não foram conclusivos, devido à variação sazonal na capacidade de resposta fitoalexínica das rubiáceas, conforme já relatado por Braga *et al.* (1991). Tentativas de minimizar a influência de fatores ambientais, quer através da utilização de plântulas crescendo em condições controladas, quer através do uso de material cultivado *in vitro*, serão de fundamental importância para determinar quanto o grau de metilesterificação das pectinas influencia a capacidade de resposta fitoalexínica em rubiáceas tropicais.

Agradecimentos - As autoras agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida para a primeira autora (proc. 99/01218-0) e pelo auxílio ao projeto temático BIOTASP (proc. 98/05124-8).

Referências bibliográficas

- ALGHISI, P. & FAVARON, F. 1995. Pectin degrading enzymes and plant-parasite interactions. *European Journal of Plant Pathology* 101: 365-375.
- AYERS, A., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. & ALBERSHEIM, P. 1976. Host-Pathogen Interactions IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology* 57: 751-759.
- BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 79-84.
- BRAGA, M.R., YOUNG, M.C.M., DIETRICH, S.M.C. & GOTTLIEB, O.R. 1991. Phytoalexin induction in Rubiaceae. *Journal Chemical Ecology* 17: 1079-1090.
- BRAGA, M.R., BOM PESSONI, R.A. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Cell wall polysaccharide composition of leaves of tropical Rubiaceae differing in phytoalexin response. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 71-78.
- CERVONE, F., LORENZO, G., DEGRÁ, L., SALVI, G. & BERGAMI, M. 1987. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 85: 631-637.
- CERVONE, F., DE LORENZO, G., SALVI, G., BERGMANN C., HAHN, M.G., ITO, Y., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. 1989. Release of phytoalexin elicitor-activity oligogalacturonides by microbial pectic enzymes. In Lutgtenberg B.J.J. (ed.) *Signal molecules in plants and plant-microbe interactions*. NATO ASI Series, vol. H36, pp. 85-89, Springer-Verlag, Heidelberg.

- CORDEIRO NETO, F. & DIETRICH, S.M.C. 1992. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. *Ciência e Cultura* 44: 342-344.
- CÔTÉ, F. & HAHN, M.G. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.
- DAAS, J.H.P., MEYER-HANSEN, K., SCHOLS, H.A., DE RUITER, G.A. & VORAGEN, A.G.J. 1999. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 318:135-145.
- DAAS, J.H.P., VORAGEN, A.G.J. & SCHOLS, H. 2000. Characterization of non-esterified galacturonic acid sequences in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 326: 120-129.
- DARVILL, A.G., AUGUR, C., BERGMANN, C., CARLSON, W., CHEONG, J.J., EBEHARD, S., HAHN, M.G. et al. 1992. Oligosaccharins - oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. *Glycobiology* 2: 181-198.
- DAVIS, K.R., LYON, G.D., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1984. Host-Pathogen Interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell fragments. *Plant Physiology* 68: 221-228.
- DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C. & CARPITA, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197:157-162.
- FRAISSINET-TACHET, L. & FEVRE, M. 1996. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology* 33: 49-53.
- FRY, S.C. 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. New York, Longman, 333p.

- HAHN, M.G., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicit phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology* 68: 1161-1169.
- HAHN, M.G., BUCHELI, P., CERVONE, F., DOARES, S.H., O'NEILL, R.A., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1989. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. p. 131-181. *In* Plant-microbe interactions. T. Kosuge & E.W. Nester eds., MacGraw-Hill publ. Co., New York.
- HEITEFUSS, R. & PAGEL, W. 1989. Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35:11-21.
- ISHII, T., THOMAS, J., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1989. Structure of plant cell walls XXVI. The walls of suspension-cultured sycamore cells contain a family of ramnogalacturonan-I-like pectic polysaccharides. *Plant Physiology* 89: 421-428.
- LE CAM, B., MASSIOT, P., CAMPION, C. & ROUXEL, F. 1994. Susceptibility of carrot cultivars to *Mycocentrospora acerina* and the structure of cell wall polysaccharides. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 139-151.
- MCCANN, M.C., SHI, J., ROBERTS, K. & CARPITA, N.C. 1994. Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant Journal* 5: 773-785.
- McMILLAN, G.P., HEDLEY, D., FYFFE, L. & PÉROMBELON, M.C.M. 1993. Potato resistance to soft-rot erwinias is related to cell wall pectin esterification. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42:279-289.

- McNEIL, M., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1980. Structure of plant cell walls. X. Ramnagalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* 66: 1128-1134.
- McNEIL, M., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1984. Structure and function of primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry* 53: 625-663.
- MOERSCHBACHER, B.M., MIERAU, M., GRAEBNER, B., NOLL, U. & MORT, A.J. 1999. Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany* 50: 605-612.
- MORT, A.J. & CHEN, E.M.W. 1996. Nature of sites hydrolyzable by endopolygalacturonase in partially-esterified homogalacturonans. *Carbohydrate Polymers* 29:129-136.
- NOTHNAGEL, E.A., McNEIL, M. & DELL, A. 1983. Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell wall elicits phytoalexins. *Plant Physiology* 71: 916-926.
- SHARP, J.K., McNEIL, M. & ALBERSHEIM, P. 1984. Host-pathogen interactions. XXVIII. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa (β -D-glucopyranosyl) D-glucitols isolated from the micelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Journal of Biological Chemistry* 259: 1321-1336.
- SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.
- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. & VANDAMME, E.J. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances and Applications in Microbiology* 39:213-294.

- SPIRO, M.D., KATES, K.A., KOLLER, A.L., O'NEILL, M.A., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. 1993. Purification and characterization of biologically active 1,4-linked α -D-oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 247: 9-20.
- WOOD, P.J. & SIDDIQUI, I.R. 1971. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry* 39: 418-428.
- ZABLACKIS, E., HUANG, J., MULLER, B., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1995. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology* 107: 1129-1138.

Legendas das figuras

Figura 1. Conteúdo de carboidratos (A, B) e atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja (C, D) dos hidrolisados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (A, C) e *R. jasminoides* (B, D) tratadas com Driselase por diferentes períodos. Açúcar total (●), ácidos urônicos (■), açúcares redutores (▲). As barras representam o desvio padrão da média.

Figura 2. Perfil em HPAEC/PAD dos monossacarídeos presentes nos hidrolisados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (B, D) e *R. jasminoides* (C, E) resultantes da incubação com Driselase por 4 h (B, C) e 8 h (D, E). A: padrão de monossacarídeos. Fuc: fucose; Ram: ramnose; Ara; arabinose; Gal: galactose; Glc: glucose; Man: manose; Xil: xilose.

Figura 3. Perfil em HPAEC/PAD dos oligogalacturonídeos presentes nos hidrolisados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (C, E, G, I) e *R. jasminoides* (D, F, H, J) resultantes da incubação com Driselase por 1 h (E, F), 2 h (G, H), 8 h (I, J). Controles (C, D). Padrão de oligogalacturonídeos GP 3-5 (A) e GP 7-22 (B).

Figura 4. Perfil em HPAEC/PAD dos oligogalacturonídeos presentes nos incubados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (C, E, G) e *R. jasminoides* (D, F, H) com tampão acetato de sódio (C, D), Endo-PG (E, F) e PME+Endo-PG (G, H) por 90 min. Padrão GP 3-5 (A) e GP 7-22 (B).

Figura 5. Conteúdo de ácidos urônicos (A, B) e atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja (C, D) dos hidrolisados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (A, C) e *R. jasminoides* (B, D) tratadas com tampão acetato de sódio (●), Endo-PG (■) e PME+Endo-PG (▲) por diferentes períodos com Endo-PG. As barras representam o desvio padrão da média. Em C e D os controles foram descontados dos demais valores.

Figura 6. Perfil em HPAEC/PAD dos oligogalacturonídeos presentes nos incubados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (A, C, E, G, I) e *R. jasminoides* (B, D, F, H, J) com tampão (A, B), Endo-PG (C, D) e PME+Endo-PG por 1h (E, F), 4h (G, H) e 8 h (I, J).

Figura 7. Conteúdo de ácidos urônicos (A, B) e atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja (C, D) dos incubados de paredes celulares de *A. myrcifolia* (A, C) e *R. jasminoides* (B, D) com tampão acetato de sódio (●), Endo-PG (■) e PME+Endo-PG (▲) por diferentes períodos com PME. As barras representam o desvio padrão da média. Em C e D os controles foram descontados dos demais valores.

Figura 8. Perfil em HPAEC/PAD dos incubados de paredes celulares de *A. myrcifolia* com tampão 40 min (B), Endo-PG 4 h (C, E), PME 10 min+Endo-PG 4 h (D) e PME 40 min+Endo-PG 4 h (F). A: padrão GP 7-22.

Figura 9. Perfil em HPAEC/PAD dos oligogalacturonídeos presentes nos hidrolisados de paredes celulares de *R. jasminoides* com tampão 40 min (B), Endo-PG 4 h (C, E), PME 10 min+Endo-PG 4 h (D) e PME 40 min+Endo-PG 4 h (F). A: padrão GP 7-22.

Figura 10. Atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja do eliciador de *Mucor ramosissimus* diluído de 0-75% em água destilada, no hidrolisado PME 1 h+Endo-PG 4 h de *R. jasminoides* e no hidrolisado PME 40 min+Endo-PG 4 h de *A. myrcifolia*. As barras representam o desvio padrão da média.

Figura 1

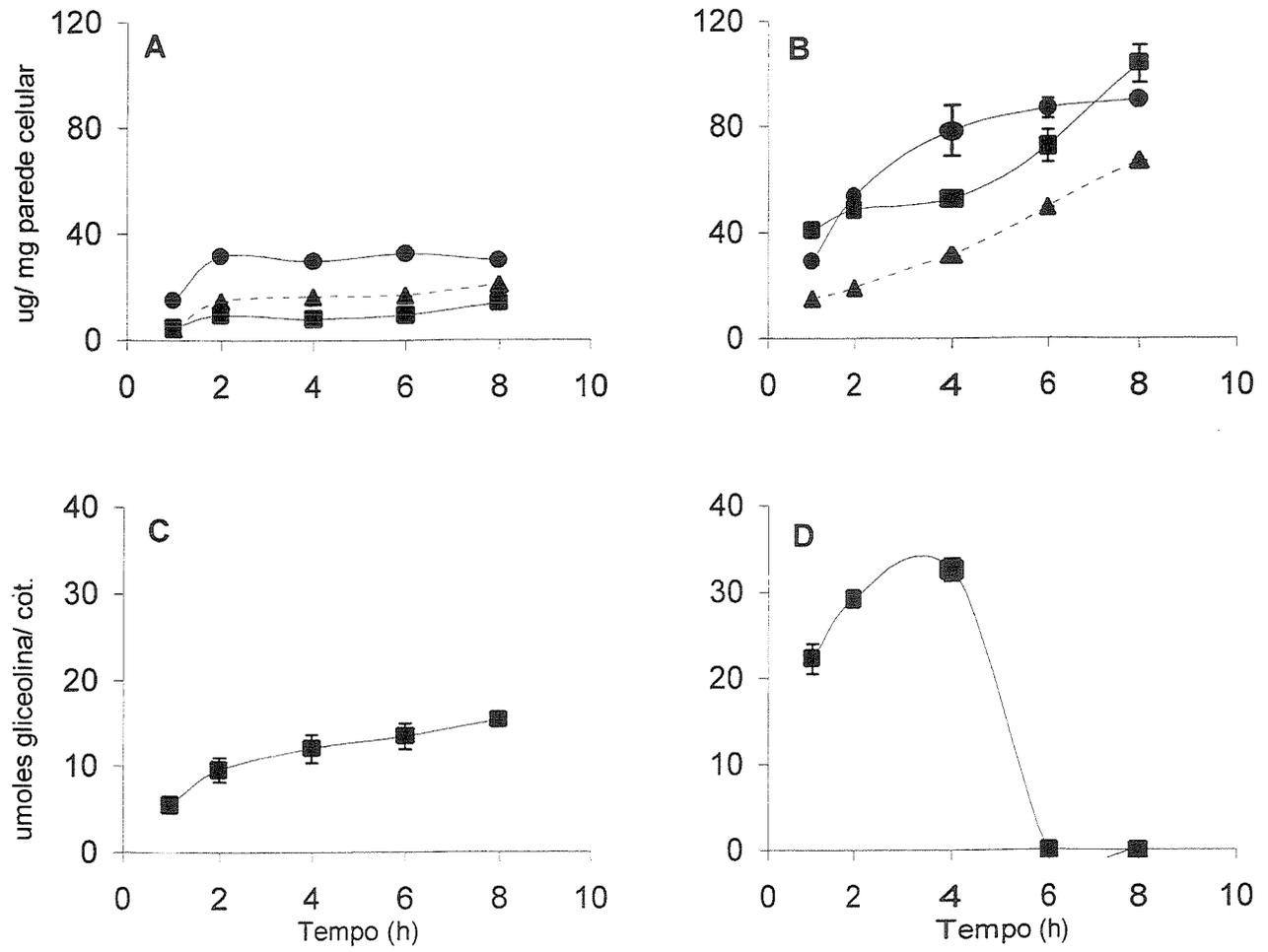


Figura 2

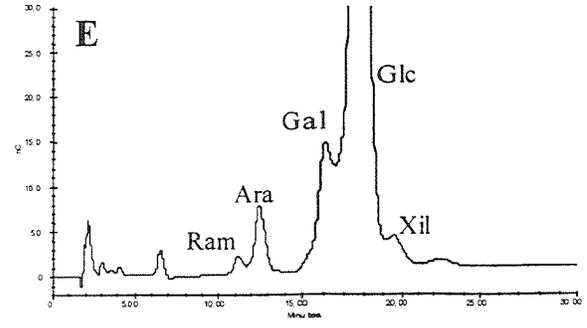
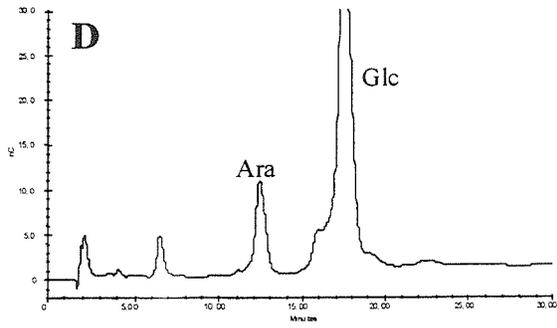
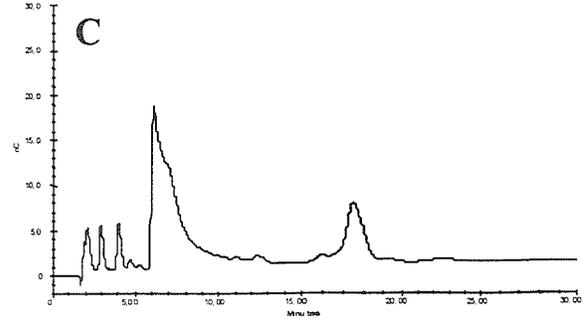
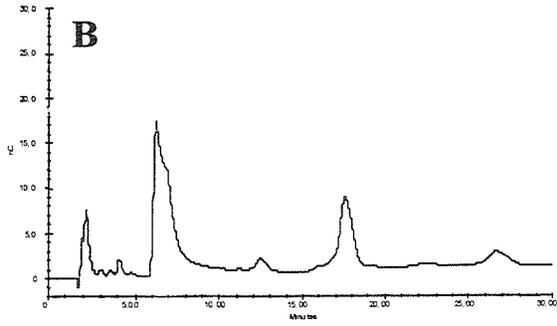
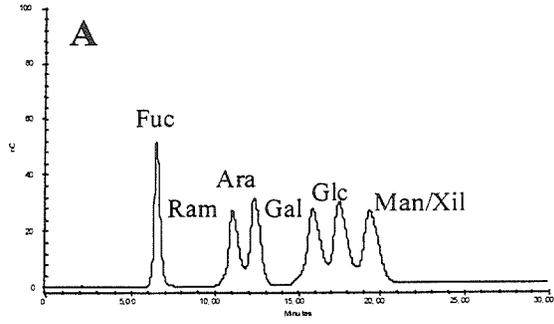


Figura 3

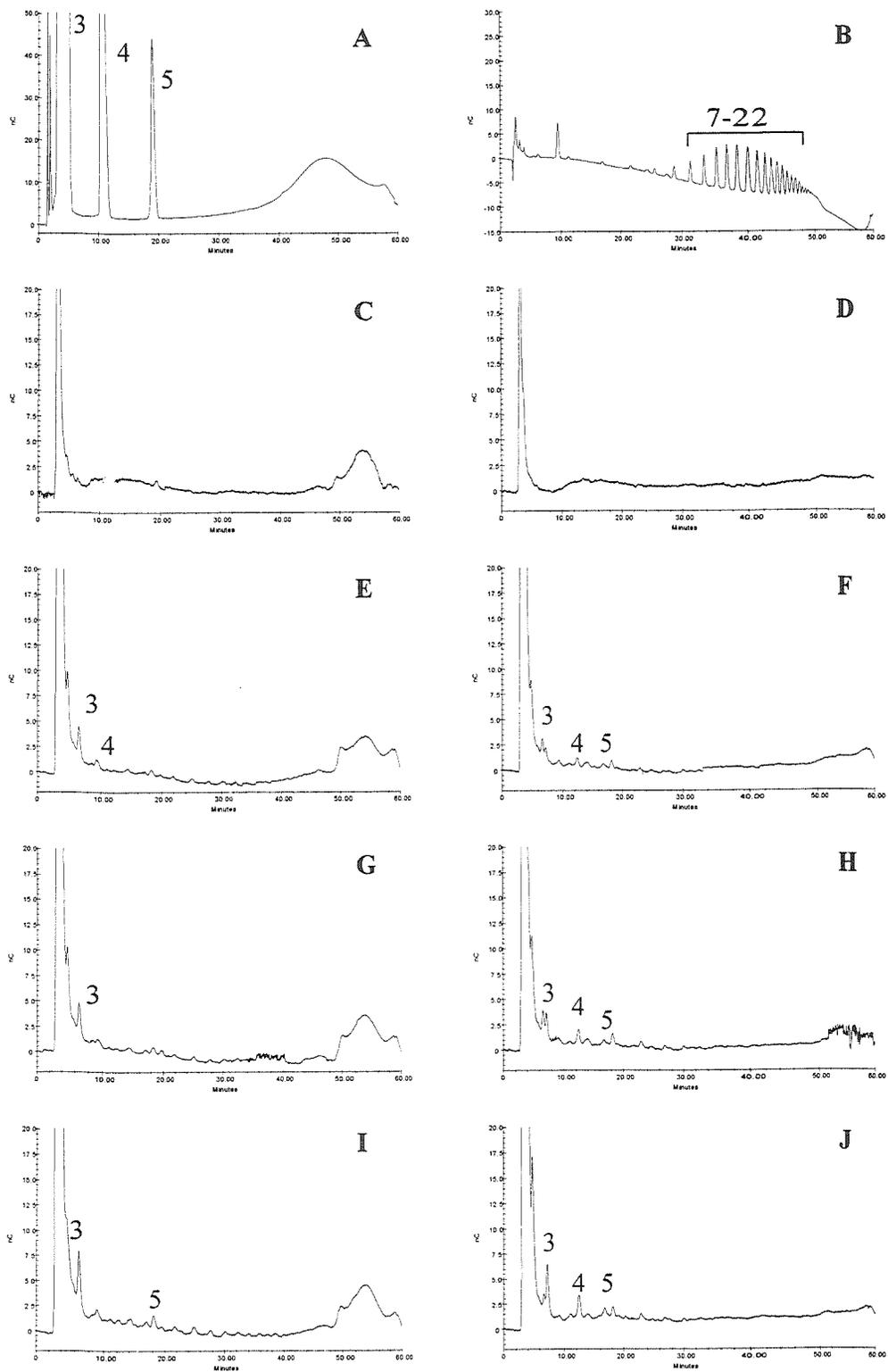


Figura 4

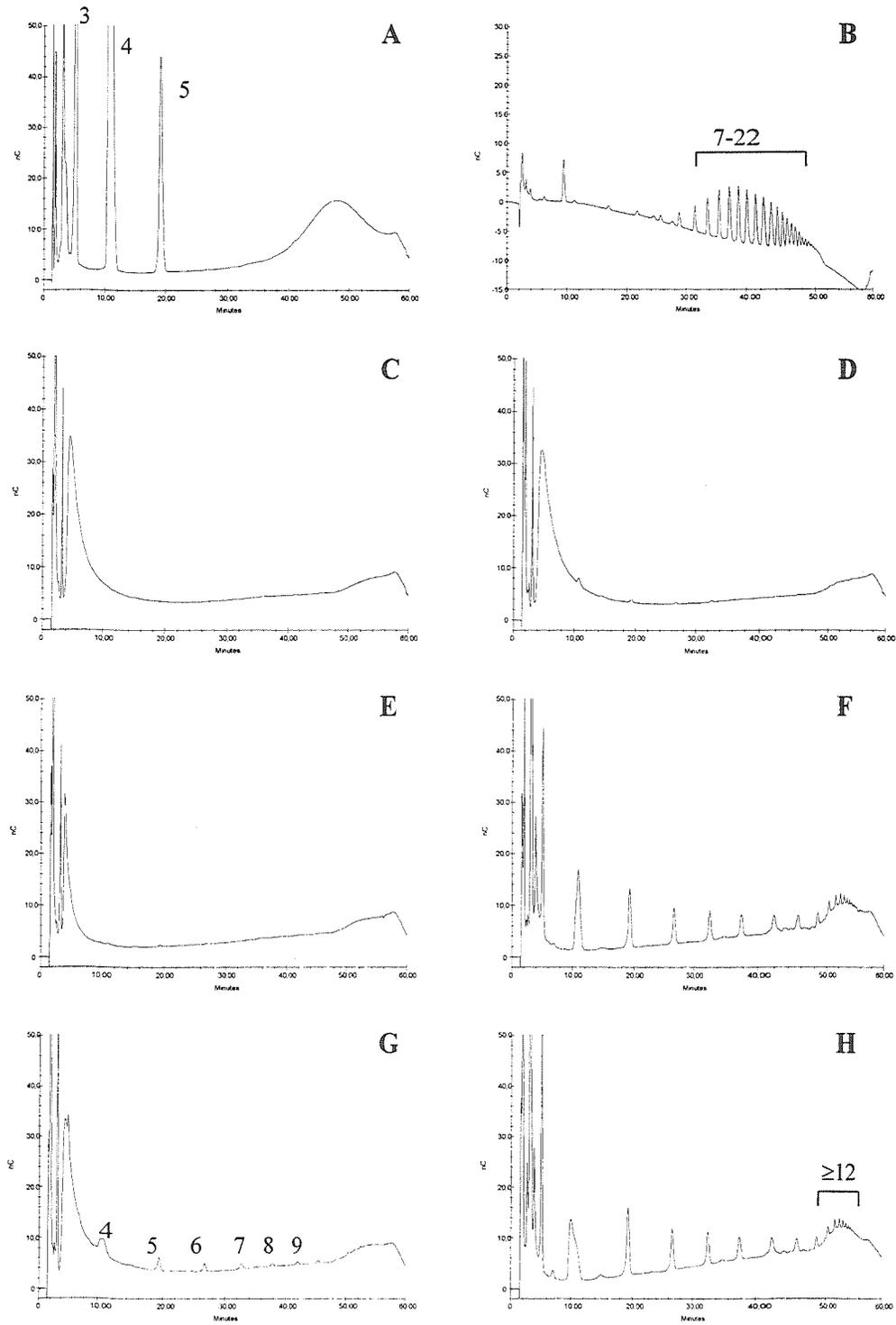


Figura 5

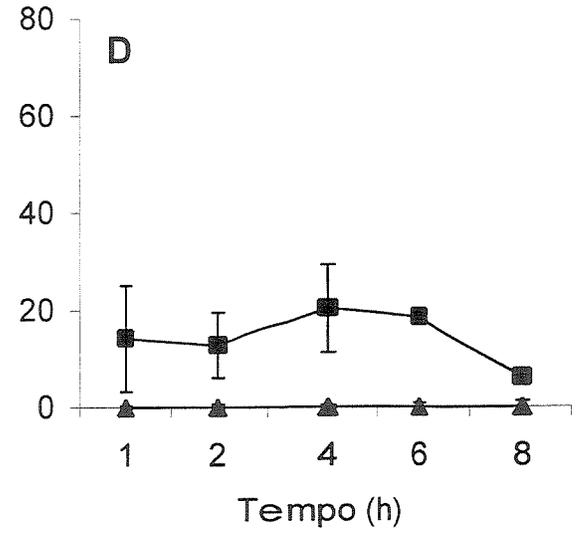
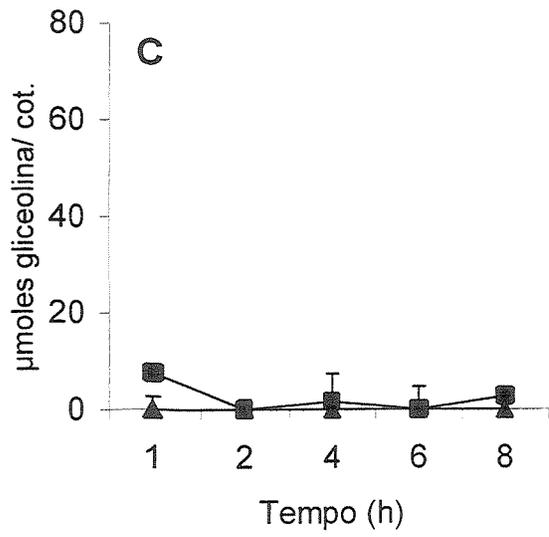
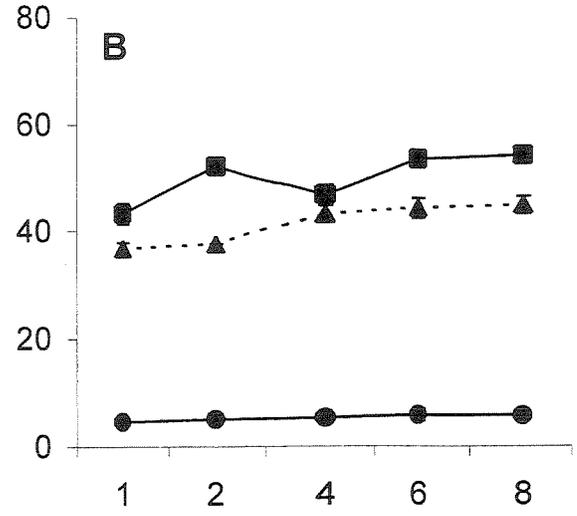
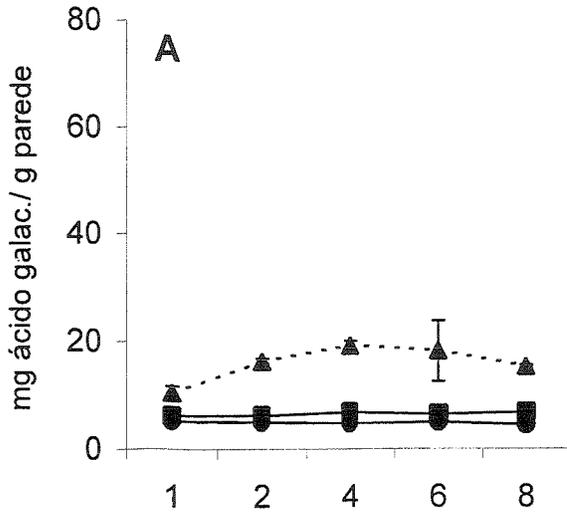


Figura 6

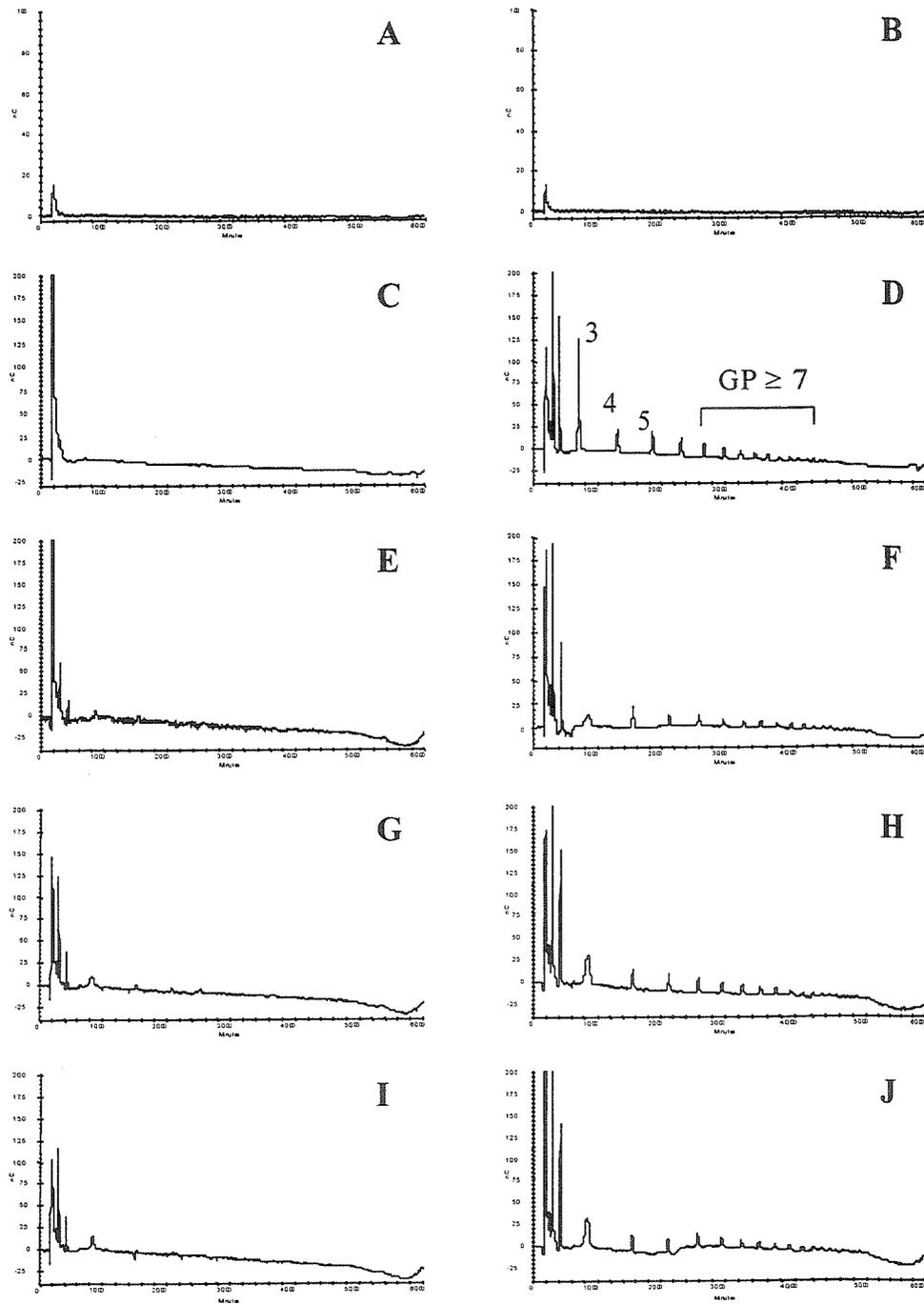


Figura 7

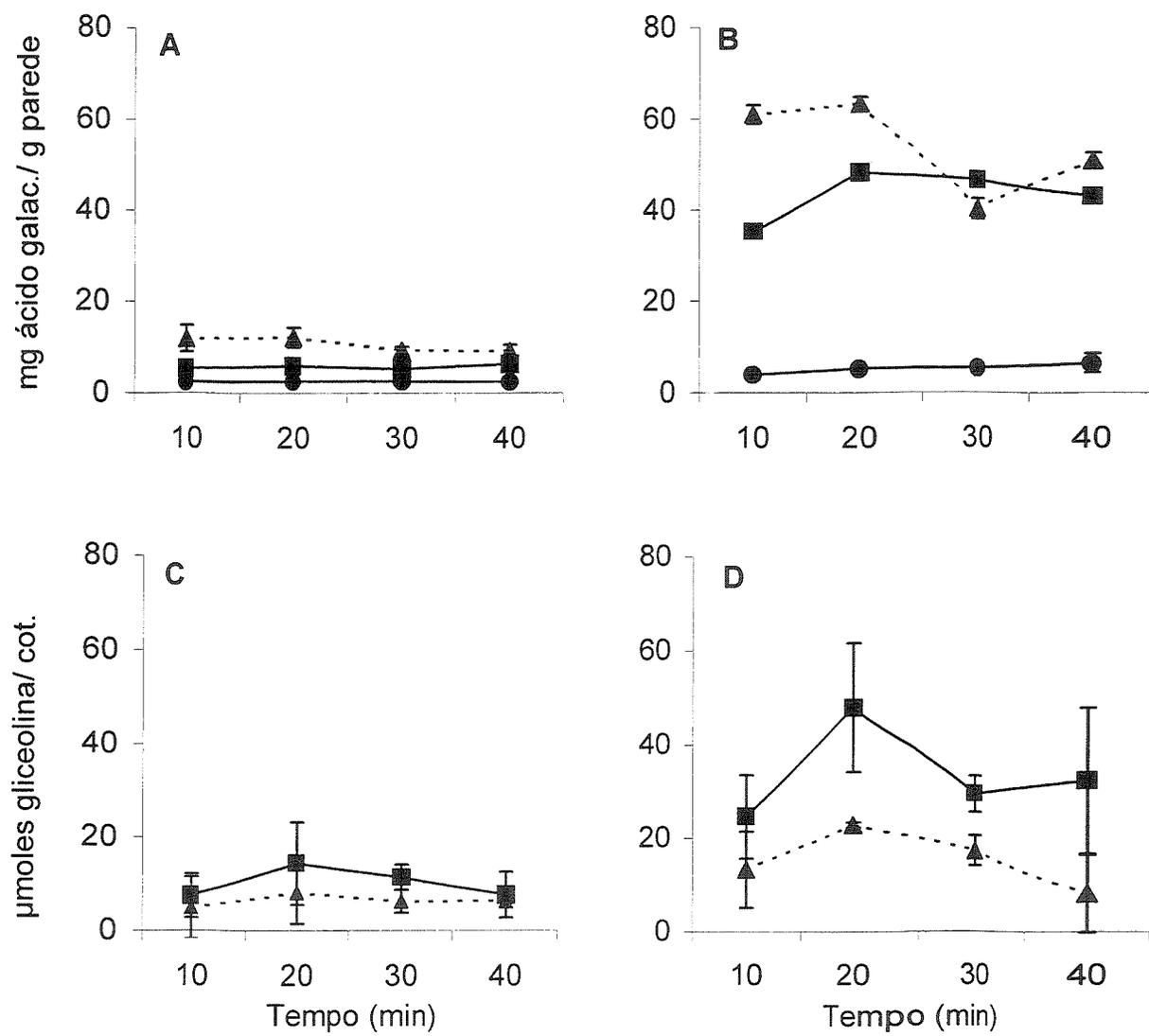


Figura 8

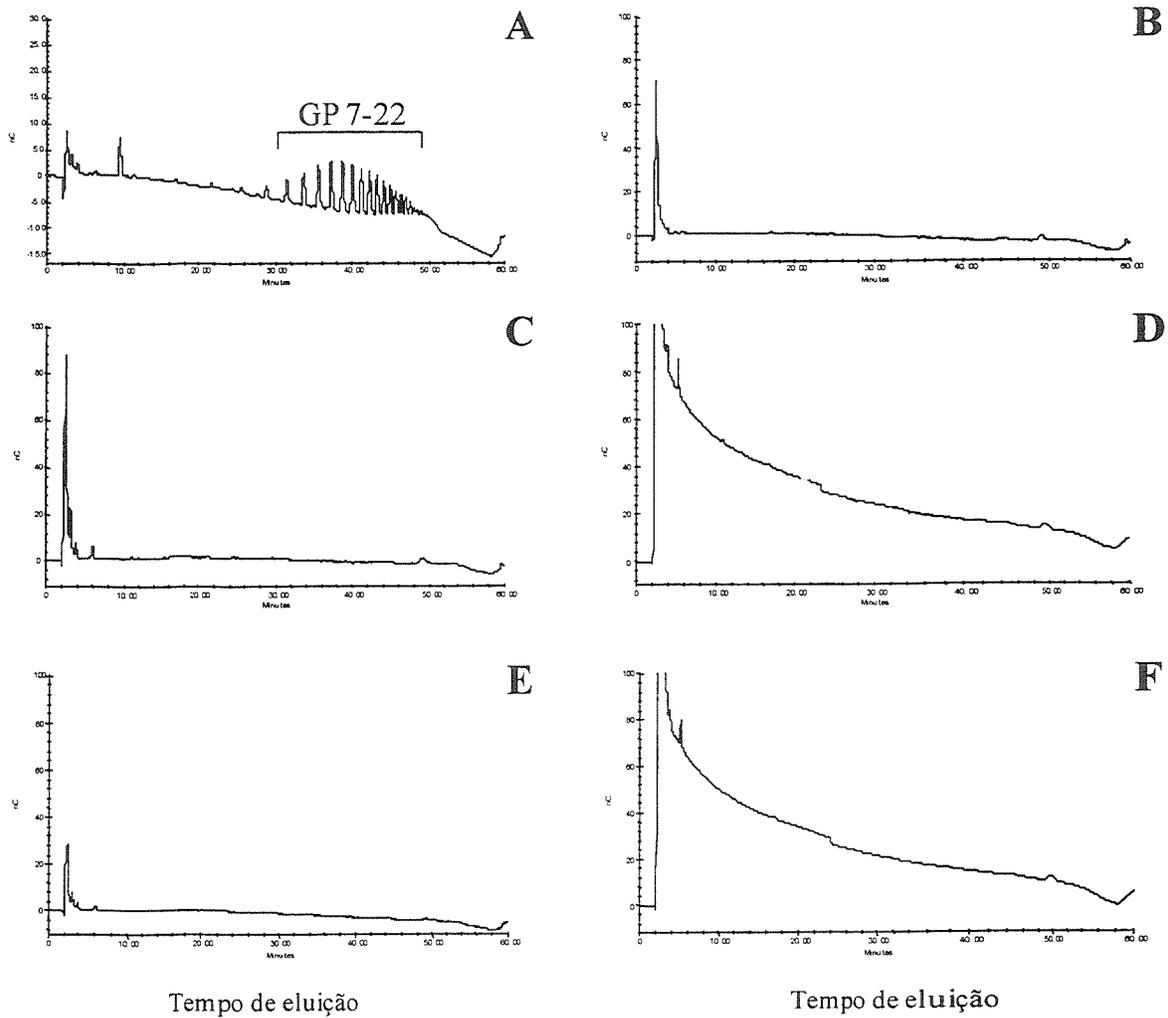
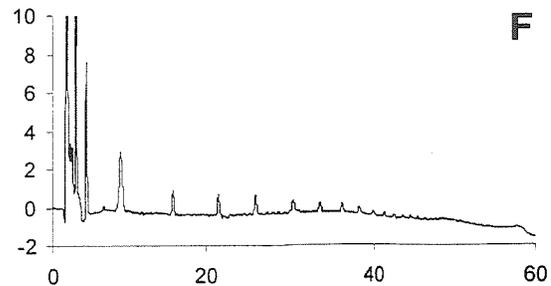
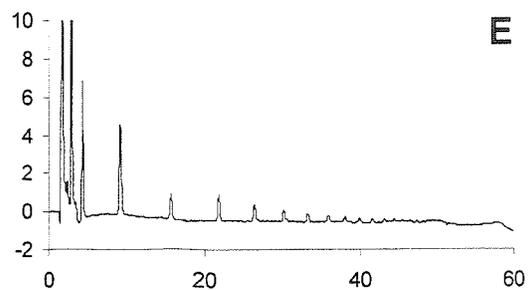
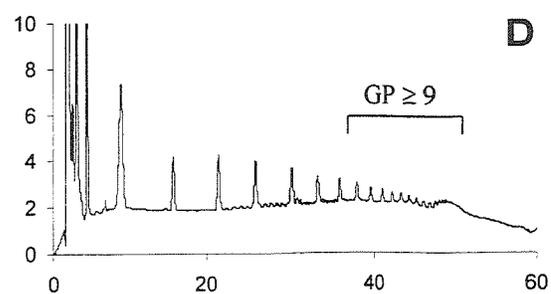
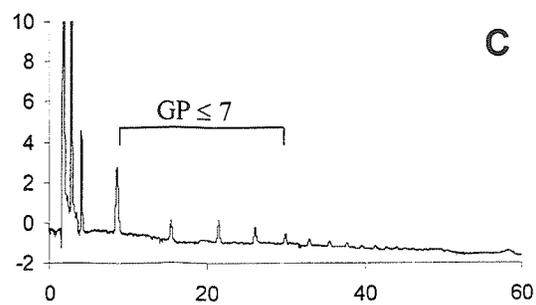
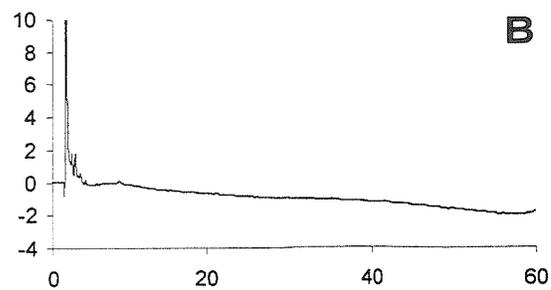
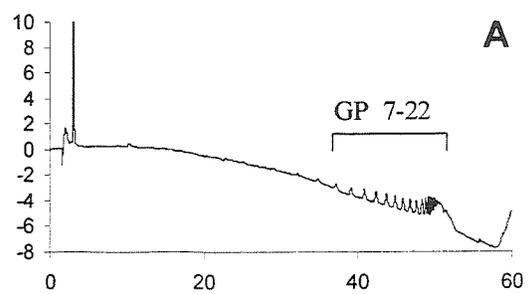


Figura 9



Tempo de eluição (min)

Tempo de eluição (min)

Figura 10

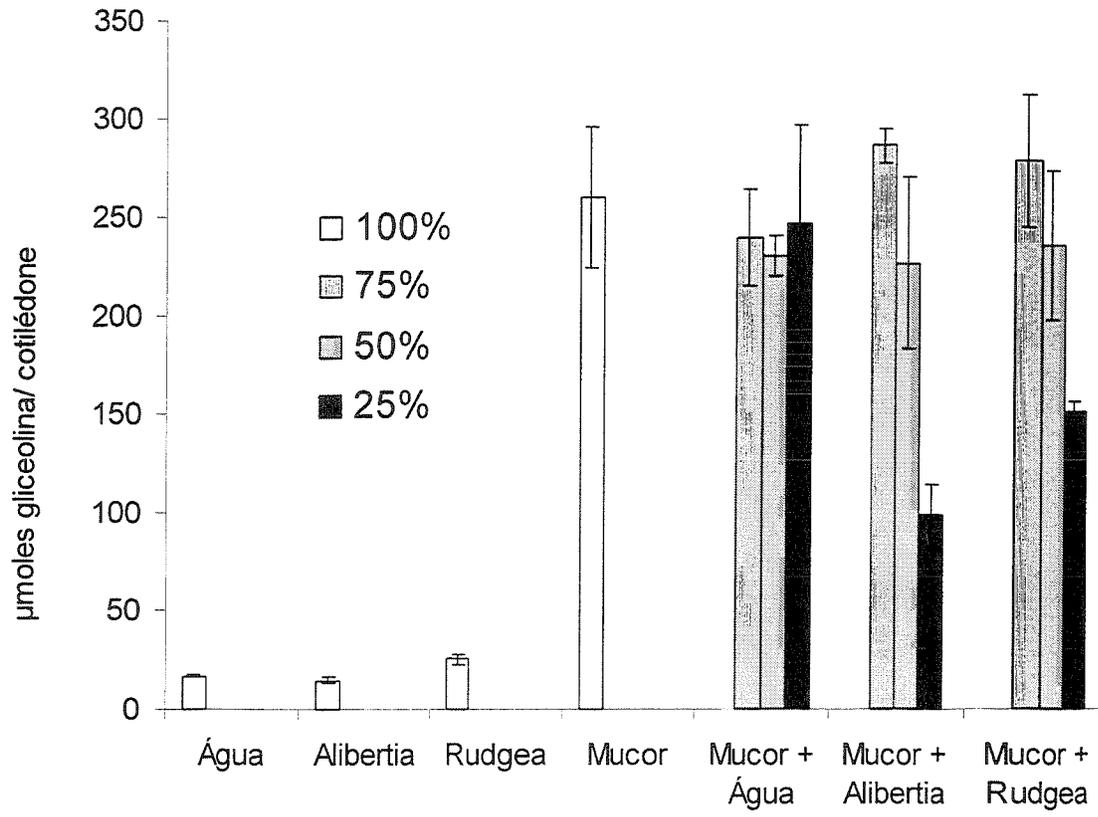


Tabela 1. Conteúdo de ácidos urônicos liberados e porcentagem de hidrólise de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* incubadas isoladamente com pectina metilesterase (PME) por 1 h e endopoligalacturonase (Endo-PG) por 8 h ou pré-tratadas com PME por 1 h e na sequência incubadas com Endo-PG por 8 h (PME+Endo-PG).

Tratamento	Hidrólise			
	<i>A. myrcifolia</i>		<i>R. jasminoides</i>	
	(mg ác.urônico/g parede)	%	(mg ác.urônico/g parede)	%
Parede+Tampão acetato de sódio, 50 mM	0	0	0	0
Parede+PME	0,22	0,02	0,03	0,003
Parede+Endo-PG	2,25	0,22	25,64	2,56
Parede+PME+Endo-PG	6,12	0,61	30,14	3,01

Tabela 2. Atividade indutora de fitoalexinas de hidrolisados de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* obtidos por tratamento isolado com endopoligalacturonase (Endo-PG) e com pectina metilesterase (PME) por 1 h e Endo-PG por 90 min, sobre cotilédones de soja. Médias acompanhadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey 1%).

Amostras	µmoles gliceolina/cotilédone	
	<i>A. myrcifolia</i>	<i>R. jasminoides</i>
Parede + tampão acetato de sódio 50 mM	32,07 bc	25,35 c
Parede + Endo-PG	37,77 bc	39,85 bc
Parede + PME + Endo-PG	37,43 bc	46,65 b
Controle (água destilada)	43,18 bc	
Eliciator de <i>Mucor ramosissimus</i>	65,86 a	

Tabela 3. Atividade indutora de fitoalexinas de hidrolisados de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* obtidos por tratamento isolado com endopoligalacturonase (Endo-PG) por 4 h, com pectina metilesterase (PME) por 40 min e na sequência com Endo-PG por 4 h e de *Rudgea jasminoides* obtidos por incubação isolada com Endo-PG por 4 ou 6 h, com PME por 1 h e na sequência com Endo-PG por 4 ou 6 h sobre cotilédones de soja. Os valores representam a média de 3 determinações. Médias seguidas de letras iguais em cada coluna não diferem estatisticamente a Tukey 5%.

Amostra	µmoles gliceolina/cotilédone		
	<i>R. jasminoides</i>	<i>R. jasminoides</i>	<i>A. myrcifolia</i>
	4 h	6 h	4 h
Hidrolisado de parede com Endo-PG 100%	42,80 d	70,0 d	-
Hidrolisado de parede com PME+ Endo-PG 100%	36,66 e	43,5 a	-
Hidrolisado de parede com Endo-PG diluído a 50% em H ₂ O destilada	43,68 d	50,6 e	-
Hidrolisado de parede com Endo-PG diluído a 50% no hidrolisado PME+ Endo-PG	33,73 e	35,5 a	-
Eliciator de <i>Mucor ramosissimus</i> *	177,64 a	113,9 b	138,90
Eliciator de <i>M. ramosissimus</i> diluído a 50% em H ₂ O destilada	136,20 b	118,4 b	-
Eliciator de <i>M. ramosissimus</i> diluído a 50% no hidrolisado PME+ Endo-PG	87,06 c	89,7 c	56,80
Controle (água destilada)*	19,20 e	33,2 a	19,11

- não ensaiado; * Resultados de 3 ensaios conduzidos isoladamente, apresentados em colunas distintas, com os respectivos hidrolisados ensaiados.

ARTIGO 2:

“Aspectos morfo-anatômicos e citoquímicos de folhas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae)”, A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO*

*As normas utilizadas foram aquelas descritas para a Revista Brasileira de Botânica.

Aspectos morfo-anatômicos e citoquímicos de folhas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae)

CLAUDIA ALVES DA SILVA^{1,3}, EDENISE SEGALA ALVES² e MARCIA REGINA
BRAGA^{3,4}

Título resumido: Anatomia foliar de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*

-
1. Mestranda, Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, UNICAMP.
 2. Seção de Anatomia, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970, São Paulo, SP.
 3. Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970, São Paulo, SP.
 4. Autor para correspondência: bragamr@canalvip.com.br

ABSTRACT - (Morpho-anatomical and cytochemical aspects of leaves of *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. and *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae)). Leaves of *Alibertia myrcifolia*. and *Rudgea jasminoides*, two tropical Rubiaceae species with distinct phytoalexin response, were compared by light (ML) and scanning (MEV) and transmission electron microscopy (MET). In both species the leaf blade is dorsiventral with one-layered palisade in *R. jasminoides* and a two-layered one in *A. myrcifolia*. Parallelcitic stomata are located only on the abaxial surface for both species. Differences were observed in the petiole shape, thickness of adaxial cuticle and organization of the spongy parenchyma between the two species. Remarkable differences were also seen with regard to the Toluidine Blue and Periodic Acid/Schiff Reactive (PAS) stainings, indicating the predominance of acidic material in the *R. jasminoides* mesophyll. These results together with immunolocalization analysis by MET confirmed the differences in leaf cell wall composition previously reported for these Rubiaceae species, which might be related to their distinct phytoalexin response when challenged by fungi.

RESUMO – (Aspectos morfo-anatômicos e citoquímicos de folhas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae)). Foram estudados aspectos da anatomia foliar de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* por microscopia de luz (ML), eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), com o objetivo de comparar essas duas espécies, que diferem quanto à capacidade de produzir fitoalexinas. Ambas folhas são do tipo dorsiventral, sendo observadas 1 camada de células no parênquima paliçádico de *R. jasminoides* e duas no de *A. myrcifolia*, hipoestomáticas. Estômatos paralelocíticos estão presentes apenas na superfície abaxial das duas espécies. Diferenças foram observadas no formato do pecíolo, na espessura da cutícula e na organização do parênquima lacunoso entre as espécies. Diferenças marcantes também foram observadas nas colorações com Azul de Toluidina

e PAS, indicando predomínio de material de caráter ácido no mesofilo de *R. jasminoides*. Esses resultados juntamente com as análises de imunolocalização realizadas por MET confirmaram as diferenças previamente observadas na composição da parede celular das folhas das duas rubiáceas. É possível sugerir que essas diferenças, aliadas a outros fatores morfo-fisiológicos, possam influenciar a indução da síntese de fitoalexinas quando as folhas dessas rubiáceas são inoculadas com fungos.

Key words – leaf, anatomy, Rubiaceae, phytoalexin, pectin

Introdução

A folha, por ser o órgão da planta mais exposto às condições ambientais, sofre modificações morfológicas e anatômicas que são consideradas como adaptações aos fatores ambientais a que está submetida (Fahn 1964, Mendes & Paviani 1997). Ela também serve como substrato para o crescimento de comunidades epífilas, formadas por musgos, líquens, algas, fungos e bactérias (Coley & Kursar 1996), sendo, muitas vezes, o principal alvo para o ataque de microrganismos patogênicos, que ao penetrar em seus tecidos causam doenças que podem levar inclusive à morte da planta.

O estudo das características morfo-anatômicas foliares é de extrema importância, pois além de fornecer subsídios à taxonomia vegetal (Stace 1965, Saddi 1988), tais características influenciam diretamente processos fisiológicos como a fotossíntese e o transporte de água, determinando, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida pela folha e a magnitude da transpiração cuticular. Caracteres morfo-anatômicos também participam da defesa contra parasitas e patógenos, funcionando como barreiras estruturais à invasão microbiana (Hahn *et al.* 1989).

A família Rubiaceae é uma das famílias mais representativas da Mata Atlântica, com cerca de 10.700 espécies subordinadas a aproximadamente 637 gêneros, distribuídos principalmente nas regiões tropicais (Robbrecht 1988). Braga *et al.* (1991, 1998), estudando rubiáceas arbóreas nativas tropicais quanto à produção de substâncias de defesa (fitoalexinas), verificaram que nenhuma espécie do gênero *Alibertia* produziu estas substâncias quando inoculada com esporos de fungos, enquanto que a maioria das espécies do gênero *Rudgea* respondeu positivamente à inoculação. A comparação da composição das paredes celulares de duas rubiáceas tropicais, *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*, mostrou diferenças

significativas na fração de pectinas, que é a fonte de moléculas sinalizadoras, diretamente envolvidas na indução de respostas químicas de defesa em plantas (Braga *et al.* 1998). Recentemente, Silva & Braga (dados não publicados) verificaram diferenças no grau de metilesterificação (GM) das pectinas das paredes celulares dessas duas rubiáceas, sugerindo que estas diferenças poderiam influenciar na capacidade de resposta fitoalexínica das espécies.

Dentre os trabalhos sobre anatomia foliar de espécies de Rubiaceae, destaca-se o de Accorsi (1947), que analisou a ocorrência de células anexas dos estômatos em 553 espécies, pertencentes a 107 gêneros de Rubiaceae, definindo a presença dessas células como um caráter anatômico de importância taxonômica para a família; o de Vieira (1986), que estudou a anatomia foliar de *Diodia radula*; os de Vieira *et al.* (1992), que trabalharam com *Psychotria nuda* e *P. leiocarpa* e Mantovani *et al.* (1995), que analisaram, através da microscopia de luz (ML), a anatomia foliar de *Rudgea decipiens* e *R. macrophylla*. Em nível de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Vieira & Gomes (1995) estudaram a superfície foliar de *P. nuda*, *P. leiocarpa*, *P. stenocalyx* e *P. tenuinervis*.

Aspectos ultra-estruturais e imunocitoquímicos, em nível de microscopia eletrônica de transmissão (MET), relacionados à composição da parede celular de folhas e outros órgãos vegetais têm sido explorados, em diversas espécies vegetais, através do auxílio de diversos anticorpos, que reconhecem epitopos específicos (Freshour *et al.* 1996). Especificamente para a análise de pectinas, diferenças no grau de metilesterificação (GM) podem ser vistas através da imunolocalização com os anticorpos monoclonais JIM-5 e JIM-7, que reconhecem epitopos com diferentes padrões de metilesterificação (Knox *et al.* 1990, Dolam *et al.* 1997, Femenia *et al.* 1998).

Neste trabalho, foram estudados aspectos da anatomia foliar de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* através de análises por MEV, ML e MET, com o objetivo de ampliar o

conhecimento sobre a estrutura das folhas dessas espécies, que diferem quanto à capacidade de se defender contra o ataque de microrganismos, e de fornecer subsídios para melhor compreensão das diferenças bioquímicas encontradas na composição de suas paredes celulares.

Material e métodos

Folhas de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex. Schum.) (SP 28307) Schum. e *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (SP 161348), completamente expandidas e sem lesões, foram coletadas na mata da Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no Instituto de Botânica, localizado no interior da região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. O parque está localizado entre as coordenadas 23°38' - 23°40'S e 46°36' - 46°38'W. A área total do parque é de 549,31 ha, ocupando a mata cerca de 345 ha, delimitados em uma Reserva Biológica. O clima da região é do tipo Cwa (Köppen 1948). As médias anuais de temperatura situam-se entre 17 °C e 19,5 °C, sendo fevereiro o mês mais quente e julho o mais frio (Gomes 1992).

Para o estudo em nível de ML, folhas recém coletadas e inteiras de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* foram fixadas em FAA 70 (Johansen 1940). Após 48 h, as folhas foram conservadas em álcool etílico 70% até o seu processamento. Com o auxílio de lâmina de barbear, foram obtidas à mão livre, secções transversais do pecíolo e do limbo foliar de ambas espécies. As secções foram obtidas a partir de amostras da folha retiradas de sua região mediana na altura do bordo e da nervura central. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 20% e, em seguida, submetidas ao processo de dupla coloração com azul de astra e safranina aquosos (Johansen 1940), sendo montadas em glicerina 66%. O material foi observado e fotografado em microscópio de luz Zeiss, Jenamed 2.

Para os testes histoquímicos, foram retiradas, com o auxílio de uma lâmina de barbear, porções retangulares do mesófilo foliar de ambas espécies sendo estas submetidas à fixação com glutaraldeído 0,1% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato de potássio 0,05 mM pH 7 por 24 h. Posteriormente, o material foi lavado em tampão fosfato por 3 vezes (30 min cada) e colocado em solução de tampão fosfato com 0,15 M de glicina, por uma noite. Após desidratação em série etanólica (etanol 70, 80 e 95% por 30 min cada e etanol 100% por 2 vezes de 15 min cada), o material foi infiltrado em etanol: Histo-resina 2:1, 1:1, 1:2 por 4 h cada etapa e em resina pura por 24 h, seguida de inclusão em cápsulas de gelatina, com polimerização em estufa a 60 °C por 48 h. Foram efetuados cortes semifinos (250 nm) em micrótomo LKB Bromma 8800 e estes observados em microscópio óptico Zeiss, Jenamed 2, após as colorações específicas descritas a seguir.

Para visualização dos radicais aniônicos totais *in situ*, parte das secções foi coberta com uma solução de Azul de Toluidina (AT) 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0, por 15 min à temperatura ambiente. Na sequência, as secções foram lavadas rapidamente em água destilada e secas ao ar (Vidal 1977). A lâmina foi, então, imersa em xilol por 10 min e montada em entelam. A detecção de radicais catiônicos totais foi feita através de coloração dos cortes pelo Xylidine Ponceau (XP) a 0,1% em ácido acético 3% pH 2,5 por 15 min. Os cortes foram lavados em solução de ácido acético 3% por 30 min e 2 vezes em água destilada por 5 min cada. Seguiu-se uma desidratação em etanol 95% e 100% por 2 min cada (Cortelazzo 1992). A lâmina foi igualmente imersa em xilol e montada em entelam, como citado acima. Para a detecção de polissacarídeos neutros, foi realizada a coloração com Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS). As secções foram cobertas com uma solução de ácido periódico 0,5% por 9 min. Em seguida, foram lavadas em água destilada por 3 vezes, e secas. Na sequência, foram tratadas com reativo de Schiff por 30 min a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após coloração, foram

submetidos a 3 banhos em água sulfurosa (18 partes de água, 1 parte de HCl 1N, 1 parte de metabissulfito de sódio 10%) por 3 min cada, seguidos de desidratação etanólica 95% e 100% por 2 min cada, imersão em xilol por 10 min e montagem em entelam (Cortelazzo 1992).

Para observações ao nível de MEV, foram retiradas, com o auxílio de um bisturi, secções retangulares do mesofilo de folhas recém coletadas de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*. Essas secções foram montadas em “stubs” especiais para MEV, congeladas e liofilizadas. Em seguida foram metalizadas em metalizador Baltec SCD 050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura XL 20 Phillips, com aceleração de 10 KV.

Para preparação de cortes semifinos e finos visando observações ao nível de MET, folhas recém coletadas de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* foram lavadas em água corrente e porções de 2 mm² foram retiradas do mesofilo e imediatamente fixadas, à temperatura ambiente, em glutaraldeído 1% + paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,0. Na seqüência, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 50 mM (3 X 15 min), pós-fixadas no mesmo tampão contendo 1% de tetróxido de ósmio por 1h 30 min. As amostras foram então lavadas em tampão cacodilato de sódio (3 X 30 min), desidratadas em série etanólica (30,50, 70, 85, 95, 100%), e então o material foi infiltrado com resina LRWhite : etanol (1:1, 2:1, 48 h cada), seguido de mais 48 h em resina pura, e a polimerização efetuada em estufa a 60 °C, durante 48 h. O material foi seccionado em ultramicrotomo, sendo os cortes semifinos (250 nm) montados sobre lâminas de vidro para ML (para controle) e os cortes finos (<100 nm) sobre telinhas de níquel para MET, conforme descrito por Freshour *et al.* (1996).

Para imunolocalização e posterior observação em MET, cortes finos foram montados sobre telinhas de níquel, hidratados por 5 min com tampão TBS (TRIS-salino) 10 mM. Os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados pela incubação dos cortes com 3% de albumina de

soro bovino (BSA) em tampão TBS e incubados com JIM-5 e JIM-7 por 60 min. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão TBS e incubados com o anticorpo anti-rato IgG Sigma conjugado com ouro coloidal (10 nm) por 60 min, e lavados com tampão TBS e água destilada (Dolam *et al.* 1997). As telinhas foram então contrastadas com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo, visualizadas em Microscópio Zeiss e fotografadas.

Resultados e Discussão

Nas figuras 1 e 2 são apresentadas, respectivamente, as características foliares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*. O pecíolo de *A. myrcifolia* (figura 1 A, B) apresenta formato circular, possuindo córtex compacto, com células pequenas e, em secção transversal, com contorno circular. O sistema vascular apresenta um feixe central na forma de anel contínuo. Para *R. jasminoides* (figura 2 A, B), o pecíolo se apresenta no formato plano-convexo, sendo sulcado na face adaxial, com córtex semelhante ao de *A. myrcifolia*. O sistema vascular está presente na forma de um arco. Ambas espécies não possuem fibras esclerenquimáticas. Mantovani *et al.* (1995) descreveram o pecíolo de *R. decipiens* e *R. macrophylla* também como tendo formato plano-convexo. Esse padrão também é semelhante àquele descrito por Vieira *et al.* (1992) para duas espécies de *Psychotria*.

Em *A. myrcifolia*, a organização do sistema vascular da nervura principal da folha reflete a do pecíolo (figura 1 D), sendo observado córtex compacto, com células circulares em secção transversal. Em *R. jasminoides* (figura 2 D), o córtex também se mostra compacto, com células globosas. O tecido vascular revela-se circundado por fibras esclerenquimáticas em uma camada contínua, estando disposto sob a forma de um círculo aberto. Ambas espécies apresentam

colênquima angular, observado nas faces abaxial e adaxial. Mantovani *et al.* (1995) descreveram padrão de organização do sistema vascular semelhante para *R. decipiens* e *R. macrophylla*.

Em *A. myrcifolia* (figura 1 C), a cutícula, presente na superfície adaxial é mais espessa quando comparada a de *R. jasminoides* (figura 2 C). Em ambas espécies a epiderme é unisseriada, tanto na superfície adaxial como na abaxial. Quando comparadas as células epidérmicas das superfícies adaxial e abaxial de *A. myrcifolia*, verifica-se que essas últimas, em secção transversal, apresentam forma cúbica enquanto que aquelas da superfície adaxial são arredondadas. Em *R. jasminoides*, as duas epidermes, em secção transversal, apresentam células em formato circular. As paredes anticlinais das células epidérmicas da superfície adaxial de *R. jasminoides* apresentam-se mais espessadas (figura 2 C). Não foram observados tricomas ou glândulas nas duas espécies analisadas.

Na figura 1 G, observa-se por MEV a superfície abaxial de *A. myrcifolia*, com vários estômatos, do tipo paralelocítico, com fenda longa e estreita, e células anexas de diferentes tamanhos. Em ambas espécies, as folhas são hipoestomáticas e os estômatos estão ao mesmo nível das demais células epidérmicas (resultados não mostrados). Folhas hipoestomáticas e estômatos paralelocíticos também foram observados por Vieira *et al.* (1992) e Mantovani *et al.* (1995) em seus estudos com rubiáceas. A cutícula se apresenta pouco estriada. Para *R. jasminoides* (figura 2 G) foram visualizados estômatos paralelocíticos, também com fenda longa e estreita e sua cutícula se apresenta bastante estriada. Accorsi (1947) relatou a ocorrência de cutícula estriada na família Rubiaceae e através da análise de 553 espécies, incluindo as duas espécies aqui estudadas, definiu a presença de tal característica nas células anexas de estômatos, que caracterizam a família. A superfície adaxial de *A. myrcifolia* apresenta-se estriada (figura 1 H). Para *R. jasminoides*, além de estriada, sua superfície adaxial também se apresenta levemente sulcada (figura 2 H). Não foram observadas papilas ou tricomas nas duas espécies.

Vieira & Gomes (1995) observaram hifas de fungos distribuídas na superfície abaxial de quatro espécies de *Psychotria*, correlacionando este fato com o ambiente no qual as espécies são encontradas, ou seja, ambientes com alta umidade relativa, que proporciona o estabelecimento da micoflora. Cordeiro-Neto & Dietrich (1992), estudando a superfície foliar de *A. myrcifolia*, *R. gardenioides* e *Palicourea marcgravii*, três espécies de sub-bosque, verificaram que a micoflora existente nas folhas destas rubiáceas varia sazonalmente, sendo a maior diversidade de esporos encontrada no outono-inverno. Folhas de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* foram coletadas em primavera-verão e outono-inverno, sendo observadas, entre as duas espécies, diferenças na quantidade de hifas de fungos existentes na superfície foliar, que foi bem maior em *A. myrcifolia* (figura 1 G). Entretanto, não foram observadas diferenças na quantidade de hifas relacionadas à época do ano em que as espécies foram coletadas, que também são de sub-bosque. É possível sugerir que a presença de menor quantidade de hifas sobre o filopiano de *R. jasminoides* (figura 2 G) quando comparada a *A. myrcifolia* possa estar relacionada à capacidade da primeira espécie em responder rápida e intensamente com a produção de substâncias de defesa (fitoalexinas), que são exsudadas, quando inoculada com esporos de fungos, conforme relatado por Braga *et al.* (1991). Porém, por outro lado, a participação de outras características foliares, que podem funcionar como barreiras pré-formadas à invasão microbiana, não pode ser desconsiderada.

O mesofilo de *A. myrcifolia* (figura 1 C) é constituído pelos parênquimas paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico está disposto em 2 camadas de células alongadas, sendo uma delas formada por células menores e a outra por células maiores, que em alguns pontos confundem-se com as células do parênquima lacunoso. Está localizado junto à epiderme adaxial, caracterizando desta maneira, o tipo de folha dorsiventral. O parênquima lacunoso de *A. myrcifolia* é constituído por 4 camadas de células circulares, de tamanhos variados,

compactamente dispostas, com poucos espaços intercelulares, e em maior proporção quando comparado ao parênquima paliçádico. Em *R. jasminoides* (figura 2 C), o parênquima paliçádico é único, com células poligonais. O tipo de folha também é dorsiventral. O parênquima lacunoso de *R. jasminoides* é constituído por 7 camadas de células variadas, frouxamente dispostas, originando grandes espaços intercelulares. Apresenta-se em maior proporção quando comparado ao parênquima paliçádico (figura 2 C). Mantovani *et al.* (1995) também observaram o parênquima paliçádico único e diversidade de camadas de células no parênquima lacunoso em *R. decipiens* e *R. macrophylla*. Metcalfe & Chalk (1950) relataram tipo de folha dorsiventral para espécies de Rubiaceae. Em ambas espécies não se registrou presença de idioblastos e cristais.

As figuras 1 E e F correspondem, respectivamente, às secções transversal e longitudinal da folha de *A. myrcifolia* observada ao MEV. Visualiza-se, em ambas secções, o parênquima paliçádico, o parênquima lacunoso, a epiderme superior e a epiderme inferior. A preparação de material foliar de *A. myrcifolia* para MEV mostrou-se bastante difícil, uma vez que o processo de desidratação prévia das folhas antes da metalização, comprometeu a integridade estrutural das células, não permitindo a obtenção de uma imagem mais adequada da estrutura foliar. Para *R. jasminoides* (figura 2 E e F), foram visualizadas as mesmas estruturas encontradas para *A. myrcifolia*, porém o número e espaçamento entre células foi distinto, conforme já observado por ML e descrito acima. Para *R. jasminoides*, ocorreu melhor preservação do material, indicando que existem diferenças na resistência foliar quando se comparam as duas espécies, possivelmente como consequência das diferenças de organização relacionadas ao número e espaçamento das células das duas espécies.

A análise citoquímica de secções transversais de folhas de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* mostrou que, na coloração com AT, onde se espera que pectinas e cromatina sejam coradas, ambas as espécies revelaram intensa metacromasia das paredes celulares das células

epidérmicas (coloração arroxeada). Em *A. myrcifolia* (figura 3 A), o citoplasma de algumas células foi corado em tom esverdeado (ortocromático), principalmente nos parênquimas paliçádico e lacunoso. A região periférica das células mostrou-se azul, sugerindo a presença de materiais com diferença de afinidade pelo corante. Várias células apresentaram um conteúdo não identificado. Essa coloração ortocromática poderia sugerir a presença de conteúdo protéico, porém, além de não serem visualizados corpos protéicos nesse material, a utilização de Xylidine Ponceau (XP), que cora proteínas em vermelho, não confirmou essa sugestão (corte não mostrado). Outra sugestão seria a presença de compostos fenólicos, que foram encontrados em grande quantidade em folhas *A. myrcifolia* (Braga *et al.* 1991). Ainda em *A. myrcifolia*, foi observado que entre os parênquimas ocorre um conjunto de células em tom azul claro onde são observados nitidamente os núcleos. Um feixe vascular, corado em azul claro, também pode ser notado (figura 3 A). Para *R. jasminoides*, metacromasia intensa foi observada nas paredes celulares do parênquima lacunoso, especialmente nas regiões de contato das células (figura 3 B), indicando a presença de grande quantidade de radicais aniônicos encontrados nas substâncias pécticas. Núcleos corados também são mais evidentes nas células desse parênquima.

Na coloração com P.A.S., as paredes celulares de ambas espécies mostraram-se bastante coradas, na cor magenta, evidenciando os açúcares neutros presentes nas mesmas, principalmente em *A. myrcifolia* (figura 3 C). Seu conteúdo citoplasmático mostrou-se heterogêneo, com coloração citoplasmática em algumas células diferenciadas (coradas em amarelo). Nota-se que praticamente as mesmas células que coraram em esverdeado para AT (figura 3 A) coraram em amarelo para P.A.S. Corpos globulares fortemente corados e presentes especialmente no citoplasma são grãos de amido, e ocorreram para ambas espécies, embora predominem no parênquima paliçádico de *A. myrcifolia* (figura 3 C) e nas células do parênquima

lacunoso de *R. jasminoides* (figura 3 D). Grânulos PAS-positivos também foram notados no interior das células em ambas espécies.

Para visualização das paredes celulares ao MET, cortes finos de folhas foram incubados com JIM-5 e JIM-7 e o 2º anticorpo utilizado foi o anti-rato conjugado com partículas de ouro coloidal (10 nm). Para *A. myrcifolia*, o mesofilo foliar não pôde ser bem preservado durante a fixação e posterior infiltração com a resina, resultando em secções com poucas células com paredes que permitissem boa visualização ao MET. A imunolocalização com JIM-5 revelou algumas partículas de ouro coloidal na parede celular de células do mesofilo, sugerindo que a pectina desta espécie apresenta poucas regiões não metilesterificadas (resultados não mostrados). A imunolocalização das paredes celulares com JIM-7 não foi conclusiva, não sendo possível diferenciar alguma marcação. Para *R. jasminoides* (figura 4 A), a imunolocalização com JIM-5 evidenciou a presença de maior quantidade de partículas de ouro coloidal na parede celular de células do mesofilo, em comparação à marcação com JIM-7 (figura 4 B), confirmando que as pectinas presentes nas paredes celulares de *R. jasminoides* encontram-se pouco metilesterificadas.

A análise das folhas de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* mostrou que as espécies possuem diferenças, tanto anatômicas quanto citoquímicas, que podem ser relevantes na interação planta-microrganismo. Na análise anatômica podem ser destacadas as maiores espessuras da cutícula e compactação do mesofilo de *A. myrcifolia*. Na análise citoquímica, intensa metacromasia foi observada para as paredes celulares de *R. jasminoides*, devido à presença de substâncias pécticas. Braga *et al.* (1998), analisando a composição química da parede celular dessa espécie, relataram a ocorrência de maior conteúdo de açúcares ácidos nas pectinas, quando comparadas àquelas extraídas de *A. myrcifolia*. Essas moléculas ácidas, quando hidrolisadas, dão origem a fragmentos sinalizadores de defesa percebidos pela planta. Diferenças na quantidade e atividade desses fragmentos, que são maiores em *R. jasminoides*, foram observados por Braga &

Dietrich (1998), o que está de acordo com os resultados aqui obtidos pela coloração das folhas com AT.

Apesar das dificuldades em se obter material de *A. myrcifolia* para análise ao MET, utilizando anticorpos monoclonais, os resultados já conseguidos são promissores e confirmam que existem diferenças no GM das pectinas presentes nas paredes celulares das espécies em questão, corroborando com os resultados obtidos nas análises bioquímicas da fração pectínica das paredes celulares de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* (Silva & Braga, dados não publicados). Essas diferenças no GM das pectinas podem influenciar a capacidade dos patógenos de hidrolisar as paredes celulares das folhas durante o processo de infecção e de liberarem fragmentos responsáveis pela sinalização, os quais podem estar envolvidos na indução de respostas de defesa na planta hospedeira.

Agradecimentos - As autoras agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida para a primeira autora (proc. 99/01218-0) e pelo auxílio ao projeto temático BIOTASP (proc. 98/05124-8). Nossos agradecimentos ao Dr. Elliot W. Kitajima, responsável pelo departamento NAP/MEPA (ESALQ/USP) pela disponibilização do microscópio eletrônico de transmissão e ao Dr. Keith Roberts e Dra. Maureen McCann pelo envio dos anticorpos monoclonais JIM-5 e JIM-7.

Referências bibliográficas

- ACCORSI, W. R. 1947. A ocorrência das células anexas dos estômatos na família Rubiaceae. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz IV: 411-436.
- BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell wall of tropical Rubiaceae. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10: 79-84.
- BRAGA, M.R., YOUNG, M.C.M., DIETRICH, S.M.C. & GOTTLIEB, O.R. 1991. Phytoalexin induction in Rubiaceae. Journal of Chemical Ecology 17: 1079-1090.
- BRAGA, M.R., PESSONI, R.A.B. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Cell wall composition of leaves of tropical Rubiaceae differing in phytoalexin response. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10: 71-78.
- COLEY, P.D. & KURSAR, T.A. 1996. Causes and consequences of epiphyll colonization. In Tropical forest plant ecophysiology (S.S. Mulkey, R.L. Chadon & A.P. Smith, eds.). Chapman & Hill, New York, p.337-362.
- CORDEIRO-NETO, F. & DIETRICH, S.M.C. 1992. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. Ciência e Cultura 44: 342-344.
- CORTELAZZO, A.L. 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. Revista Brasileira de Botânica 15: 157-162.
- DOLAM, L., LINSTED, P. & ROBERTS, K. 1997. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 308: 713-720.
- FAHN, A. 1964. Some anatomical adaptation of desert plants. Phytomorphology 14: 93-102.

- FEMENIA, A., GAROSI, P., ROBERTS, K., WALDRON, K.W., SELVEDRAN, R.R. & ROBERTSON, J.A. 1998. Tissue-related changes in methyl-esterification of pectic polysaccharides in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) stems. *Planta* 205: 438-444.
- FRESHOUR, G., CLAY, R.P., FULLER, M.S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G. & HAHN, M.G. 1996. Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology* 110: 1413-1429.
- GOMES, E.P.C. 1992. Fitossociologia do componente arbóreo de um trecho de mata em São Paulo, SP. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HAHN, M.G., BUCHELI, P., CERVONE, F., DOARES, S.H., O'NEILL, R.A., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1989. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. *In* Plant-Microbe Interactions (Kosuge, T. & Nester, E.W. ed.), MacGraw-Hill Publ. Co., New York, p.131-181.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. MacGraw-Hill Book Company. New York, London.
- KNOX, J.P., LINSTED, P.J., KING, J., COOPER, C. & ROBERTS, K. 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181: 512-521.
- KOEPPEN, W. 1948. Climatologia. Fundo de Cultura Econômica, México.
- MANTOVANI, A., GOMES, M., GOMES, D.M.S. & VIEIRA, R.C. 1995. Anatomia foliar de *Rudgea decipiens* Mull. Arg. e *R. macrophylla* Benth. (Rubiaceae). *Acta Botânica Brasilica* 9: 247-261.
- MENDES, I.C.A. & PAVIANI, T.I. 1997. Morfo-anatomia comparada das folhas do par vicariante *Plathymenia foliolosa* Benth. e *P. reticulata* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 20: 185-195.

- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. Volume II. p. 759-776. Clarendon Press, Oxford.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Wood Rubiaceae. Opera Botanica Belgica 1: 1-271.
- SADDI, N. 1988. Micromorphological evidence in the genus *Kielmeyera* martius (Guttiferae). Revista Brasileira de Biologia 48: 697-720.
- STACE, C.A. 1965. Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. Bulletin of the British Museum- Botany 4: 3-78.
- VIDAL, B.C. 1977. Acid glucosaminoglycans and endochondral ossification. Cellular and Molecular Biology 22: 45-64.
- VIEIRA, R.C. 1986. *Diodia radula* (Willd. et. Hoffm.) Cham. et Schlecht. (Rubiaceae). Anatomia foliar. Revista Brasileira de Biologia 46: 667-674.
- VIEIRA, R.C., GOMES, D.M.S. & FERRAZ, C.L.A. 1992. Anatomia foliar de *Psychotria nuda* Wawra e *P. leiocarpa* Mart. (Rubiaceae). Hoehnea 19: 185-195.
- VIEIRA, R.C. & GOMES, D.M.S. 1995. Superfície da lâmina foliar de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra, *P. leiocarpa* Cham. & Schltdl., *P. stenocalyx* Mull. Arg. e *P. tenuinervis* Mull. Arg. (Rubiaceae). Acta Botanica Brasilica 9: 263-270.

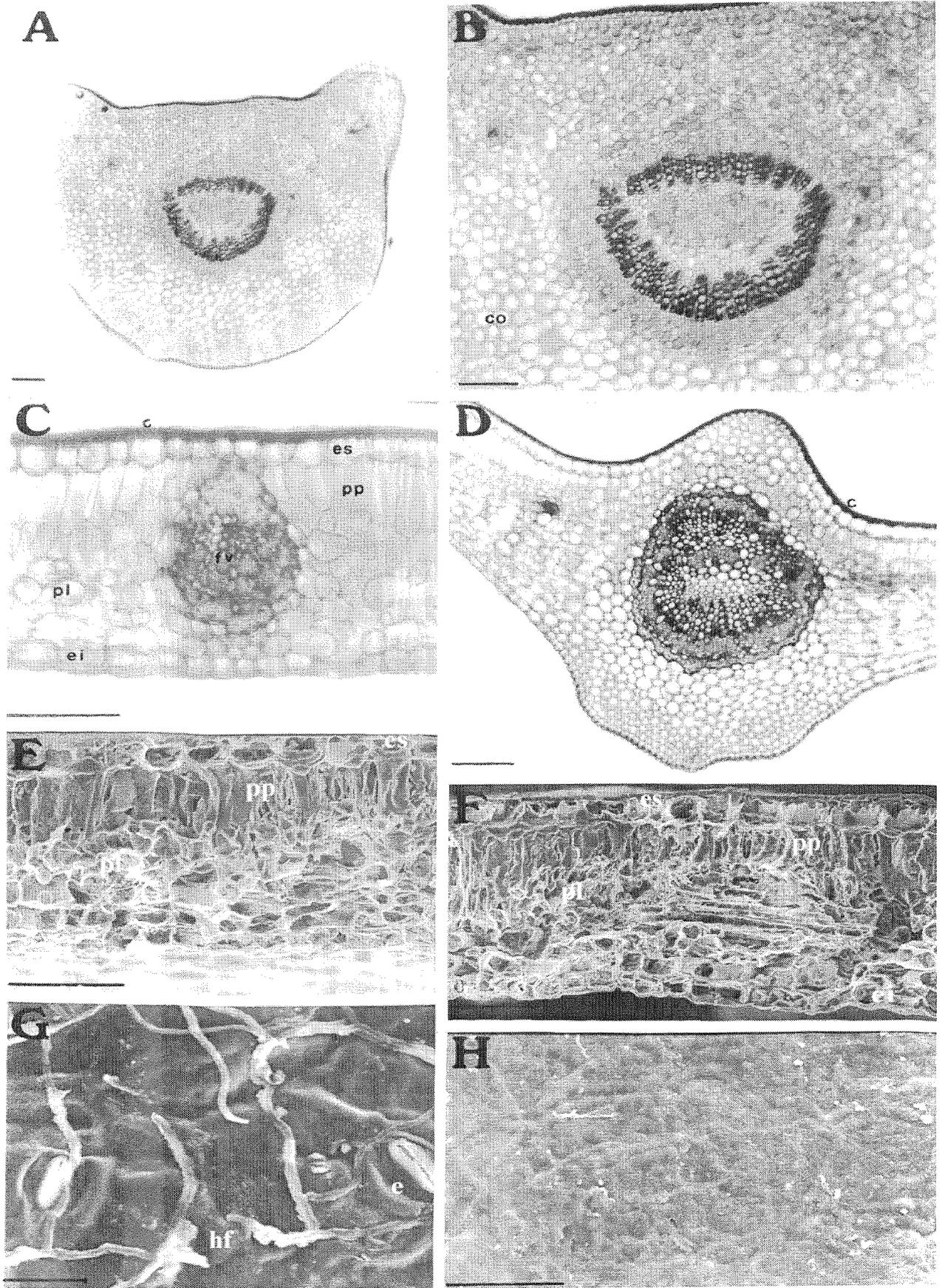
Legendas das figuras

Figura 1. *Alibertia myrcifolia*. Fotomicrografias (ML) de secções transversais do pecíolo (A, B), da folha (C, D), sendo (C) região da nervura principal e (D) região da nervura secundária. Eletromicrografias (MEV) da secção transversal (E), longitudinal (F), epiderme abaxial (G) e epiderme adaxial (H) de folhas. c: cutícula, co: córtex, e: estômato, ei: epiderme inferior, es: epiderme superior, fv: feixe vascular, hf: hifa de fungo, pl: parênquima lacunoso, pp: parênquima paliçádico. Aumentos: (A) 6,3X, (B, D) 12, 5X, (C) 25X, (E) 600X, (F) 500X, (G) 2037X, (H) 1300X. Barras = 50 μm (A-D, G, H), =100 μm (E, F).

Figura 2. *Rudgea jasminoides*. Fotomicrografias (ML) de secções transversais do pecíolo (A, B), da folha (C, D), sendo (C) região da nervura principal e (D) região da nervura secundária. Eletromicrografias (MEV) da secção transversal (E), longitudinal (F), epiderme abaxial (G) e epiderme adaxial (H) de folhas. c: cutícula, co: córtex, e: estômato, ei: epiderme inferior, es: epiderme superior, fv: feixe vascular, hf: hifa de fungo, pl: parênquima lacunoso, pp: parênquima paliçádico. Aumentos: (A) 6,3X, (B, C, D) 12,5X, (E) 600X, (F) 500X, (G) 1166X, (H) 1300X. Barra = 50 μm (A-D, G, H), = 100 μm (E, F).

Figura 3. Fotomicrografias (ML) de secções transversais de folhas de *A. myrcifolia* (A, C) e *R. jasminoides* (B, D) coradas com azul de toluidina (AT) (A, B) e ácido periódico/reactivo de Schiff (PAS) (C, D). e: estômato, ei: epiderme inferior, es: epiderme superior, fv: feixe vascular, pl: parênquima lacunoso, pp: parênquima paliçádico. As setas indicam grãos de amido. Barra = 30 μm (A, C), 50 μm = (B, D).

Figura 4. Fotomicrografias (MET) de secções de folhas de *R. jasminoides* imunolocalizadas com JIM-5, para pectinas pouco metilesterificadas (A) e JIM-7, para pectinas bastante metilesterificadas (B), evidenciando a parede celular. c: citoplasma, pc: parede celular. As setas indicam as partículas de ouro coloidal observadas(50.000X), barra = 15 μm .



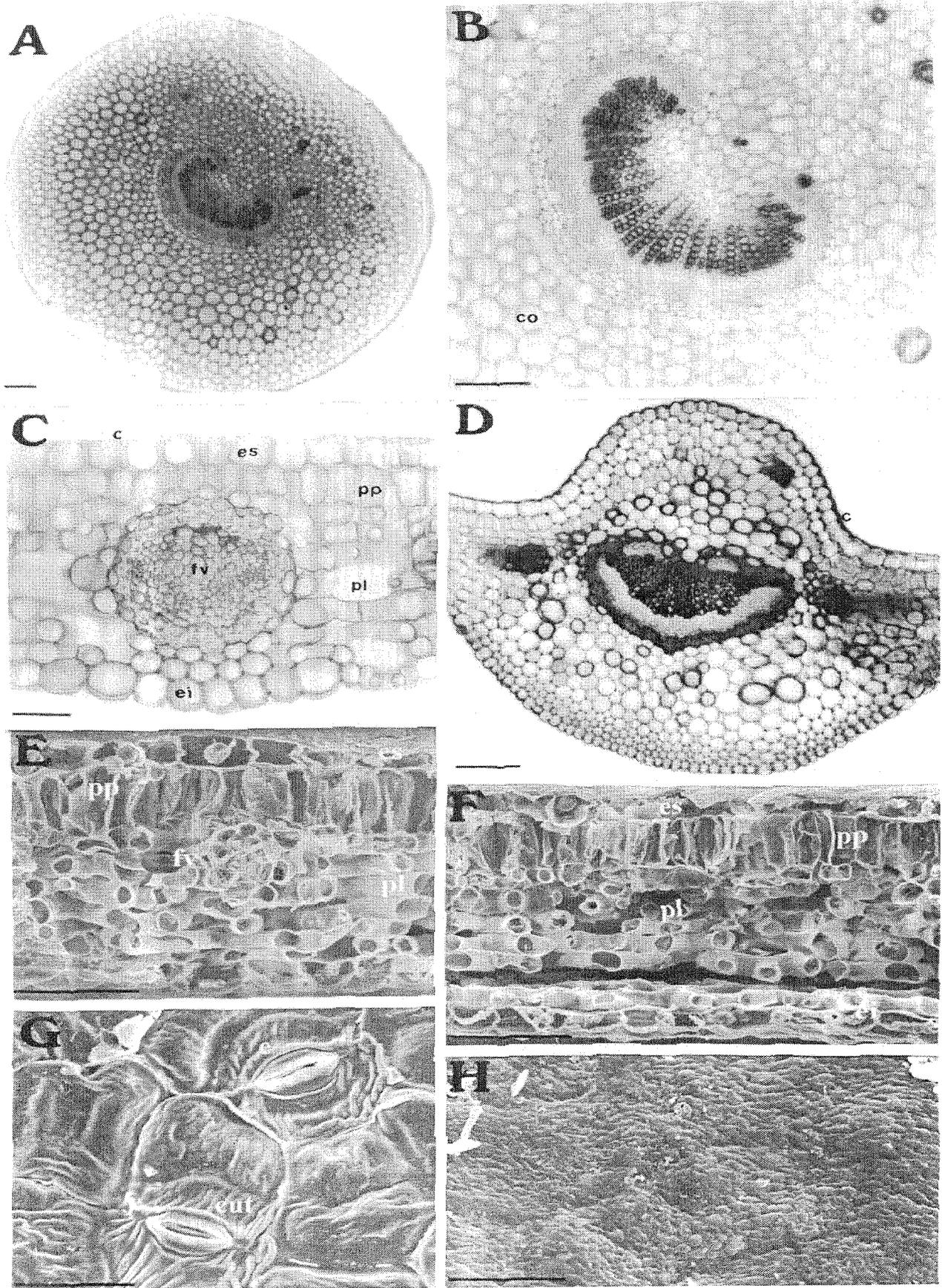


Figura 3

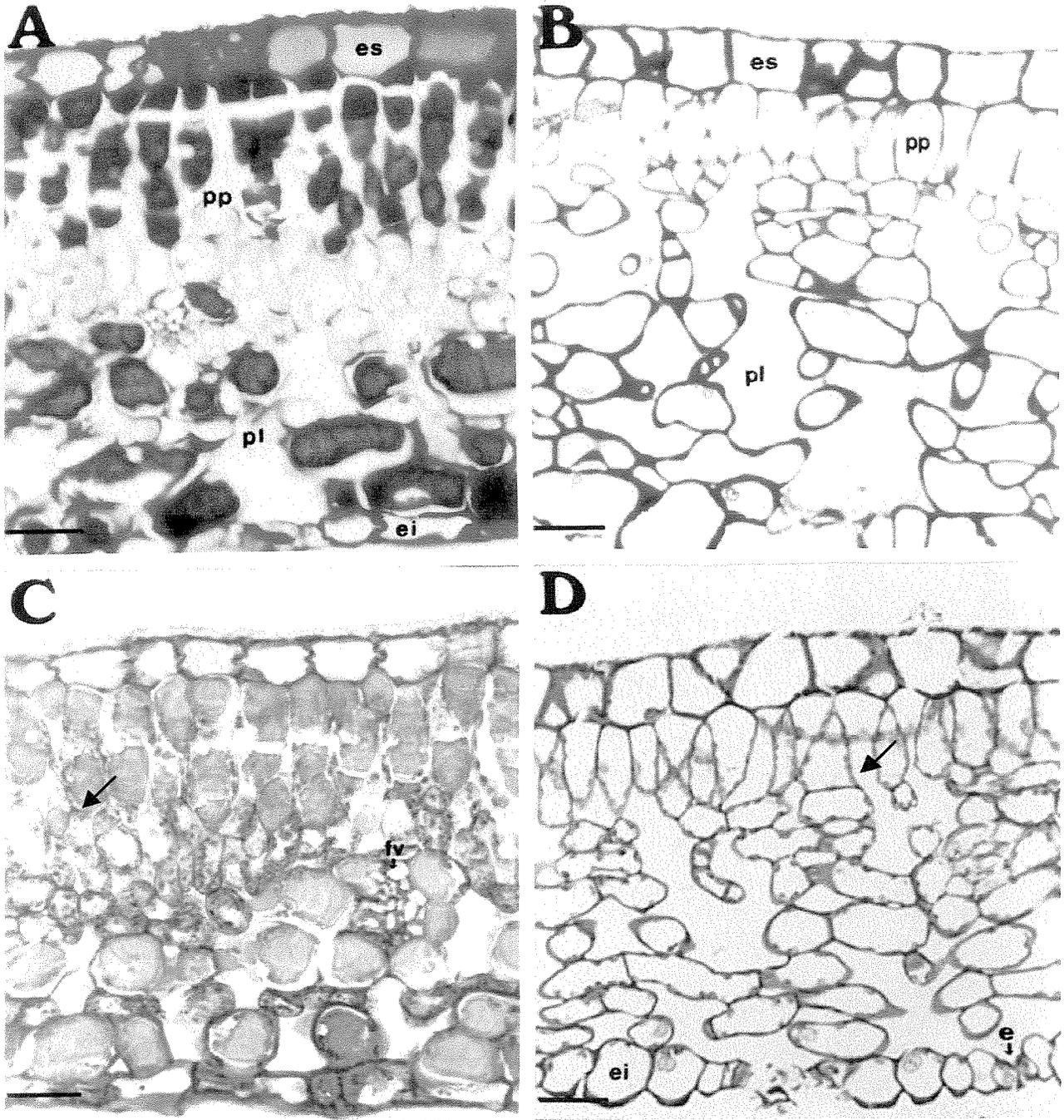
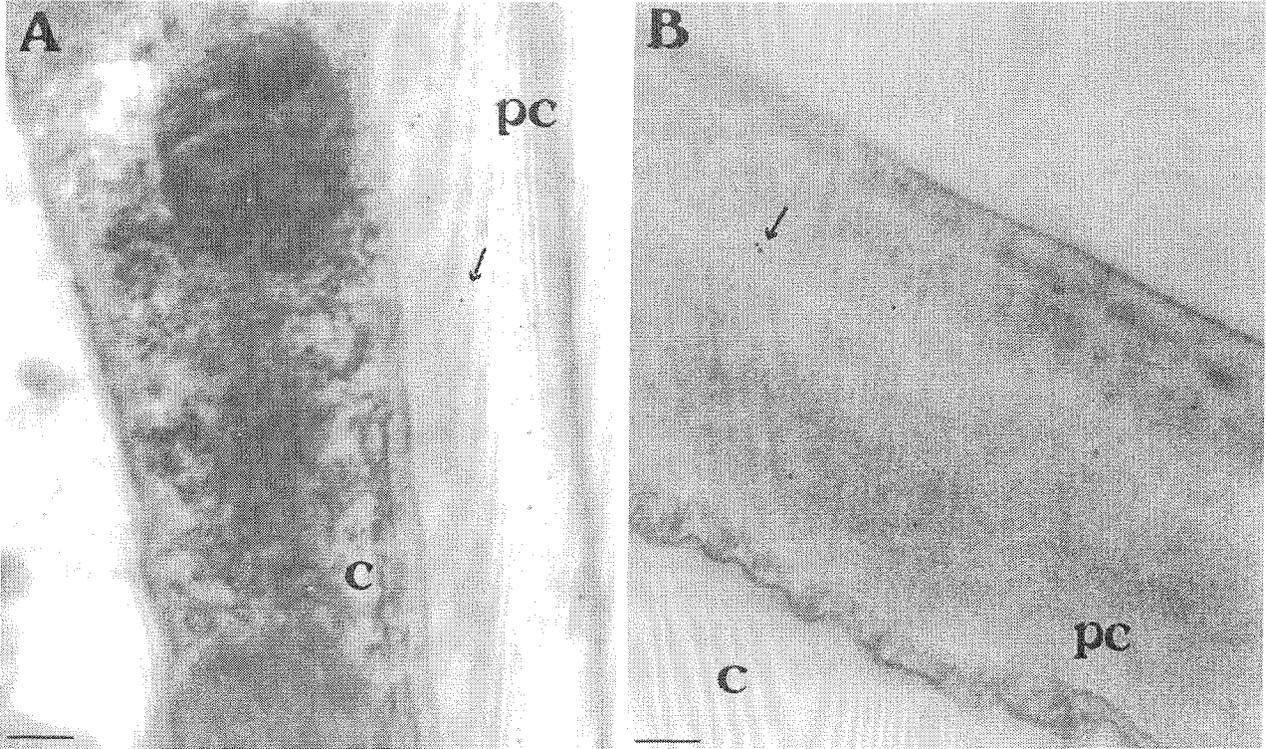


Figura 4



CONCLUSÕES GERAIS

- As análises bioquímicas e citoquímicas *in situ* da estrutura foliar de *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* demonstraram a existência de diferenças no grau de metilesterificação das pectinas de suas paredes celulares, sendo que *A. myrcifolia* apresenta-se altamente metilesterificada;
- O grau de metilesterificação das pectinas influencia a liberação de fragmentos indutores de fitoalexinas (oligogalacturonídeos) ativos em cotilédones de soja;
- O tempo de ação da pectina-metilesterase é um fator limitante para a liberação de oligogalacturonídeos ativos pela ação da endopoligalacturonase para *R. jasminoides*;
- A distribuição dos grupos metil-ésteres é extremamente importante para determinar o grau de polimerização dos oligogalacturonídeos gerados pela ação da Endo-PG e, conseqüentemente, para sua atividade;
- Oligogalacturonídeos com pequeno grau de polimerização obtidos de ambas espécies podem agir como supressores endógenos da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja, embora somente o uso desses oligogalacturonídeos isolados poderá confirmar essa sugestão;
- O grau de metilesterificação da pectina de *A. myrcifolia* pode ser um dos fatores relacionados à ausência de resposta fitoalexínica, como inicialmente sugerido, porém somente ensaios usando as próprias folhas das rubiáceas poderão trazer evidências conclusivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDINGTON, S. & FRY, S.C. 1993. Oligosaccharins. *Advances in Botanical Research* 19: 1-101.
- AYERS, A., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. & ALBERSHEIM, P. 1976. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology* 57: 751-759.
- BARON-EPEL, O., GRARYAL, P.K. & SCHINDLER, M. 1998. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175: 389-395.
- BOUDART, G., LAFITTE, C., BARTHE, J.P., FRASEZ, D. & ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. 1998. Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta* 206: 86-94.
- BRAGA, M.R., YOUNG, M.C.M., PONTE, J.V.A., DIETRICH, S.M.C., EMERENCIANO, V.P. & GOTTLIEB, O.R. 1986. Phytoalexin induction in plants of tropical environment. *Biochemical Systematics and Ecology* 14: 507-514.
- BRAGA, M.R., YOUNG, M.C.M., DIETRICH, S.M.C. & GOTTLIEB, O.R. 1991. Phytoalexin induction in Rubiaceae. *Journal of Chemical Ecology* 17: 1079-1090.
- BRAGA, M.R., BOM PESSONI, R.A. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Cell wall polysaccharide composition of leaves of tropical Rubiaceae. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 71-78.
- BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 79-84.

- BRETT, C. & WALDRON, K. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls Topics in plant physiology 2. M. Black & J. Chapman, eds. London, 194 p.
- CARPITA, N.C. 1992. A special importance of the primary cell wall in plant development. *Plant Physiology* 4: 334-336.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-10.
- CARPITA, N.C. & MCCANN, M. 2000. The Cell Wall. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B.B.Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. p. 52-109.
- CERVONE, F., LORENZO, G., DEGRÁ, L., SALVI, G. & BERGAMI, M. 1987. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 85: 631-637.
- CERVONE, F., HAHN, M.G., DE LORENZO, G., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1989. Host-Pathogen Interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiology* 90: 542-548.
- CORDEIRO-NETO, F. & DIETRICH, S.M.C. 1992. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. *Ciência e Cultura* 44: 342-344.
- CÔTÉ, F. & HAHN, M.G. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.
- DAAS, J.H.P., MEYER-HANSEN, K., SCHOLS, H.A., DE RUITER, G.A. & VORAGEN, A.G.J. 1999. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopoligalacturonase. *Carbohydrate Research* 318: 135-145.

- DARVILL, A.G., AUGUR, C., BERGMANN, C., CARLSON, W., CHEONG, J.J., EBERHARD, S., HAHN, M.G. et al. 1992. Oligosaccharins: oligosaccharides that regulated growth, development and defense responses in plants. *Glycobiology* 2: 181-198.
- DOCO, T., WILLIAMS, P., VIDAL, STÉPHANE & PELLERIN, P. 1997. Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate Research* 297: 181-186.
- DUMVILLE, J.C. & FRY, S.C. 2000. Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 125-140.
- ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T., BOUDART, G. & DUMAS, B. 2000. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 157-163.
- FRAISSINET-TACHET, L. & FREVE, M. 1996. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology* 33: 49-53.
- FRY, S.C. 1988. The growing cell wall: chemical and metabolic analysis. New York. Longman, 333 p.
- GLINKA, M.E. & PROTSENKO, M.A. 1998. Polygalacturonase inhibiting protein in plant cell walls. *Biochemistry* 63: 1015-1020.
- GOMES, D.M.S., ARRUDA, R.C.O., GOMES, M. & VIEIRA, C. 2000. Anatomia foliar de *Bathysa gymnocarpa* K. SCHUM., *B. mendonçaei*, K. SCHUM., *B. cuspidata* (ST. HIL.) HOOK. F. e *B. australis* (ST. HIL.) HOOK. F. (RUBIACEAE) da Mata Atlântica, RJ, Brasil. *Leandra* 15: 59-72.

- HARBORNE, J. B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 335-367.
- HUTCHESON, S.W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36: 59-90.
- INGHAM, J.L. 1982. Phytoalexins from Leguminosae. *In Phytoalexins*, Bailey J.A. & Mansfield J.W. (eds.), Blackie, London. p. 21-80.
- KOHORN, B.D. 2000. Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiology* 124: 31-38.
- LINERS, F. & VAN CUTSEM, P. 1992. Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. *Protoplasma*. 170: 10-21.
- MELOTTO, E & LABAVITCH, J.M. 1994. Biologically-active cell wall materials. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6: 75-82.
- NOTHNAGEL, E.A., MCNEIL, M. & DELL, A. 1983. Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell wall elicits phytoalexins. *Plant Physiology* 71: 916-926.
- PAXTON, J.D. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* 101: 106-109.
- PÉREZ, S., MAZEAU, K., & DU-PENHOAT, C.H. 2000. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 37-55.
- RAMOS-VALDIVIA, A.C., VANDER-HEIJDEN, R. & VERPOORTE, R. 1997. Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How. *Planta* 203: 155-161.

- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical Wood Rubiaceae. Opera Botanica Belgica 1: 1-271.
- SCHRIPSEMA, J., RAMOS-VALDIVIA, A. & VERPOORTE, R. 1999. Robustaquinones, novel anthraquinones from na elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochemistry* 51: 55-60.
- SMITH, C.J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. *New Phytologist* 132: 1-45.
- VAN CUTSEM, P. & MESSIAEM, J. 1994. Biological effects of pectic fragments in plants cells. *Acta Botanica Neerland* 43: 231-245.
- VAN TEGELEN, L.J.P., BONGAERTS, R.J.M., CROES, A.F., VERPOORTE, R. & WULLEMS, G.J. 1999. Isochorismate syntase isoforms from elicited cell cultures of *Rubia tinctorum*. *Phytochemistry* 51: 263-269.
- VIEIRA, R.C. 1986. *Diodia radula* (Willd. et. Hoffm.) Cham. et Schlecht. (Rubiaceae). Anatomia foliar. *Revista Brasileira de Biologia* 46: 667-674.
- VIEIRA, R.C., GOMES, D.M.S. & FERRAZ, C.L.A. 1992. Anatomia foliar de *Psychotria nuda* Wawra e *P. leiocarpa* Mart. (Rubiaceae). *Hoehnea* 19: 185-195.
- VIEIRA, R.C. & GOMES, D.M.S. 1995. Superfície da lâmina foliar de *Psychotria nuda* (Cham. & Schldl.) Wawra, *P. leiocarpa* Cham. & Schldl., *P. stenocalyx* Mull. Arg. e *P. tenuinervis* Mull. Arg. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 9: 263-270.

WHITCOMBE, A.J., O'NEILL, M.A. STEFFAN, W. ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G.
1995. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II.
Carbohydrate Research 271: 15-29.

WILLATS, W.G.T., GERRIT, L., BUCHHOLT, H.C., VAN-ALEBEEK, G.J., BENEN, J. *et al.*
2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal
antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation.
Carbohydrate Research 327: 309-320.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE