

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em
cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante
resposta de hipersensibilidade**

Roberta de Mello

RIBEIRÃO PRETO

2009

Roberta de Mello

Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante resposta de hipersensibilidade

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia

RIBEIRÃO PRETO

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

De Mello, Roberta.

Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante resposta de hipersensibilidade – Ribeirão Preto, 2009.

105 f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Vargas-Rechia, Carem Gledes.

1. Resposta de Hipersensibilidade. 2. *Rubus fruticosus*. 3. Elicitores. 4. Ácido Salicílico. 5. Metil Jasmonato. 6. Ramnoglucuronogalactana. 7. Parede Celular. 8. Componentes Extracelulares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Roberta de Mello

Título: Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante resposta de hipersensibilidade.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovada em/...../.....

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe que me deu força quando eu não estava animada e me fez companhia quando me senti sozinha e a Deus, a quem entreguei toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aqui escrevo minhas últimas palavras dedicadas a todas as pessoas que me motivaram, aconselharam, ouviram, colaboraram e participaram da minha vida e ao longo do percurso desse trabalho. Espero encontrar a melhor forma e palavras certas para declarar a minha gratidão e o meu sentimento a todos.

À Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, orientadora, que abriu as portas de seu laboratório, me acolheu numa época em que mais precisei e me encaminhou para o tema tratado nesta monografia. Agradeço pela disponibilidade de tempo e paciência revelada ao longo destes anos e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Aos meus pais, que apesar do 'débito' de atenção para com vocês; sempre me apoiaram em meus resultados acadêmicos ao longo da minha vida curricular.

Em especial, a minha querida mãe, pelo apoio incondicional, pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviu e me ajudou a caminhar sempre para frente durante toda a vida.

Aos meus amigos do laboratório, Fernando Aparecido Mariano de Souza, José Franciraldo Lima, Viviane Cristina Gumiero, Vitor Francisco dos Santos, Wagner Rodrigo de Souza, Verônica Paviani, Cibele Aparecida Cesila, Amanda Henriques Cavalheiro e Rafael de Oliveria Guaranho Garcia, agradeço pela amizade, apoio e disponibilidade de tempo, por terem me inspirado e incentivado para o caminhar desta jornada e ainda, aos acertos necessários para que eu pudesse cumprir com todas as minhas obrigações acadêmicas.

Em especial aos meus amigos: Wagner Rodrigo dos Santos, por ter me inspirado a fazer o curso de Mestrado em Ribeirão Preto, ao José Franciraldo Lima pelo apoio emocional e pelas conversas esclarecedoras e as amigas Verônica Paviani e Viviane Cristina Gumiero a qual sou grata pela atenção e dedicação.

Ao Alcides Silva Pereira e Nadir Mazzucato pelos auxílios que sempre prestaram ao nosso laboratório e que devido a isto fez com que dedicássemos maior tempo em nossos

experimentos, pela competência, amizade e por sempre levantarem o meu astral com os seus sorrisos e carismas. Obrigada pela vontade de estar sempre nos ajudando.

À Ana Cristina Morseli Polizello, Ieda Maria Razaboni Prado, Maria Regina de Pila Raphaeloski, Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini pela grande competência, discernimento e atenção dispensada a todos do laboratório de Bioquímica, mesmo quando não tinham tempo ou obrigação para isto.

Em especial a Ana Cristina Morseli Polizello pela atenção, pela competência e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Bioquímica, Felipe Augusto Godoy, Cezar Rangel Pestana, Daniela Paula dos Santos Phelippin, Everton de Oliveira Lima dos Santos, Fernando Postalli Rodrigues, Bárbara Boretti Galizoni, Daniel Junqueira Dorta, Maria Augusta Carvalho Rodrigues, Danilo Avelar, Ingrid Pontes de Sousa, Denise Pimenta Leitão, Luciana Mariko Kabeya, Andréa da Silva Figueiredo, Carolina Nakau Fuzissaki, Ana Paula Landi Librandi, Mateus Freire Leite e todos aqueles que saíram do nosso convívio e àqueles que estão entrando, agradeço de coração a atenção, amizade e consideração dispensada por vocês. Desejo sucesso a todos.

Em especial, ao Everton de Oliveira Lima dos Santos, por levantar meu astral e ao Felipe Augusto Godoy, pela simpatia e por sempre torcer por mim.

Aos Profs. Drs. do Laboratório de Bioquímica Ana Isabel de Assis Pandochi, Carlos Curti, Augusto César Cropanese Spadaro e Yara Maria Lucisano Valim, pela atenção e por terem cedido seus alunos e funcionários no desenvolvimento de meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, pela simplicidade, pelo modelo profissional e pelos assuntos descontraídos.

Ao prof. Dr. Flávio Alicino Bockmann do Laboratório de Zoologia da Faculdade de Fisiologia e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela amizade, por ter sido meu orientador na Iniciação Científica, por me mostrar na prática que os alunos se desenvolvem mais e melhor quando são valorizados.

A todos do Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto (USP) que participaram e colaboraram do desenvolvimento de minha pesquisa.

Em especial ao Hertz Figueiredo dos Santos, o Alex Melo e o Ricardo Benine, pelo incentivo à pesquisa científica e coleguismo no momento em mais precisei.

A todos que estudaram comigo na Universidade de Barão de Mauá do curso de Biologia e da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) do curso de Biotecnologia, por ter tornado os anos de faculdade tão agradáveis.

Em especial a Paulo Vieira, Juliana Tostes, Roberta Rodrigues, Walter Koji Hirono Kato, Ricardo Fagundes, Nadiele Fátima de Marco Fagundes, Eliana Valente Ramos e Paula Veridiana Ferreira Matrangulo, pelo respeito, amizade e apoio durante os anos de faculdade.

A amiga Andressa Uehara Approbato, pela sinceridade e confiança de uma verdadeira amizade.

Aos amigos Sidney Araújo, José Alberto Tercal, Estanislau Ferreira, Sumaia Castro, Andréia Soares Gonçalves, Ana Sílvia Victório de Camargo, a qual sou grata pela amizade e companhia que sempre levantou meu astral.

Aos antigos amigos Natália Siena Silva Ardenghe, Fernanda Ferreira Matrangulo, Fabrício Costacurta Braghetto, Rodrigo Diniz, Danilo Fassa, Adail Mota Neto, Ricardo Sanches, Matheus Pinheiro, Celso Hashisaka Junior e Ana Carolina Menegusse, pela consideração, boas conversas e experiências compartilhadas.

A amiga de longa jornada Roberta Aparecida Neves Granito, pela confiança, pelo carinho e pela amizade verdadeira durante esses dezoito anos.

As amigas Eliane Oliveira dos Santos e Adriana Divino Santos de Carvalho que me direcionaram no caminho de Deus, pela oração e, sobretudo pelo exemplo de vida.

A todos de minha família: minha avó Luzia Collar Cavalini, meu avô Orelho Cavalini†, meu irmão Ricardo de Mello, meus tios e tias, meus primos e primas, pelo amor, pelo estímulo e

permanente companhia e todos da família de minha cunhada Dauany Moraes, pelas alegrias proporcionadas.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso.

E, finalmente a DEUS, pela oportunidade e privilégio que permitiram compartilhar de tamanha experiência e, ao frequentar este curso, perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade, de minha vida anteriormente.

Peço perdão a todos que por muitas vezes não soube fazer sorrir, por pedir palavras quando um simples olhar deveria bastar. Arrependo-me dos meus erros, sou apenas mais um tentando melhorar.

Desculpa se esqueci de alguém!

"Deleita-te no Senhor e ele concederá o que deseja o teu
coração"

Salmos 37:4

RESUMO

De MELLO, R. **Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante a resposta de hipersensibilidade.** 2009. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A interação planta-patógeno desencadeia uma série de sinais que ainda não estão completamente elucidados. Uma das respostas é a **reação de hipersensibilidade** (RH), onde ocorre a morte celular programada no sítio da infecção, impedindo a proliferação do patógeno. Acredita-se que a morte celular é provocada pelo aumento do ERO, principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e com o acúmulo de ácido salicílico (AS) que inibe a catalase, enzima responsável pela transformação de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Além disso, ocorre o aumento da síntese e liberação dos compostos fenólicos e alteração da parede celular dos vegetais, com o aumento das atividades de diversas enzimas, capazes de degradar a parede celular da planta e do microrganismo invasor, liberando fragmentos que podem atuar como moléculas sinalizadoras, tornando as plantas mais resistentes. Nesse trabalho as células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) foram tratadas, separadamente, com três diferentes moléculas elicitoras, ou seja, moléculas capazes de ativar o mecanismo de defesa das plantas, o **ácido salicílico** (AS), o **metil jasmonato** (MeJA) e **ramnoglucuronogalactana** (F-I), na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ durante 1h, para o estudo dos componentes extracelulares liberados e das modificações dos monossacarídeos da parede celular durante resposta de hipersensibilidade. A concentração de proteínas totais extracelulares foi aumentada com os indutores **F-I** e **MeJA**. A atividade enzimática de β -D-xilosidase não se alterou na presença de **F-I**, **AS** e **MeJA**. Entretanto, o **MeJA** tem a capacidade de aumentar as atividades das enzimas β -D-galactosidase, β -D-glucosidase, quitinase e laminarinase e inibir as atividades das enzimas galacturonase e α -L-fucosidase na concentração e tempo usado. O **AS** e **F-I** provocaram um aumento nas atividades de galacturonase e quitinase e inibiram a laminarinase. A aplicação exógena de **F-I** e **AS** induziram a liberação de compostos fenólicos para meio extracelular, que provavelmente, foi decorrente da tentativa das células de se protegerem de microrganismos invasores, com um decréscimo desses compostos no meio intracelular. O **MeJA** não foi capaz de alterar a síntese de compostos fenólicos totais intracelulares e extracelulares e de açúcares extracelulares, em tais condições. Também **F-I** e **AS** não alteraram o teor de açúcar redutor extracelular. O **MeJA** foi mais efetivo na produção de ERO durante 30 minutos de incubação na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. **F-I** foi também ativador na liberação de ERO, no entanto, o **AS** provocou inibição. Os principais monossacarídeos neutros que constituem a parede celular de suspensão de células de *Rubus fruticosus* são a glucose (55-61%), arabinose (22-29%) e manose (13,8-15%). Ocorrendo em menores concentrações os monossacarídeos de fucose (0,65-1,2%), galactose (0,5-0,8%), xilose (0,5-0,8%) e ramnose (aproximadamente 0,5%). Os monossacarídeos ramnose, fucose, xilose e galactose de parede celular tiveram um decréscimo na presença do **AS** e um aumento na presença de **MeJA**. Entretanto, o **AS** e o **MeJA** não alteraram o percentual de arabinose, manose e glucose. O **F-I** foi capaz de aumentar o percentual dos monossacarídeos ramnose e fucose e diminuir de glucose. Os resultados obtidos demonstram que a via de ativação dos mecanismos de defesa da célula vegetal, induzida pelo **MeJA**, difere das vias ativadas pelo **AS** e **F-I**, pois o **F-I** e o **AS** induziram a liberação de compostos fenólicos e o **MeJA** provocou aumento nas atividades enzimáticas, principalmente que atuam na parede celular da própria planta. O **AS** e o **F-I** foram mais efetivos no aumento das atividades enzimáticas relacionadas à defesa da planta, as quais agem nas paredes de diversos fitopatógenos, sendo que as enzimas que podem atuar na parede celular da própria planta foram inibidas ou não sofreram alteração.

Palavras-chave: Resposta de hipersensibilidade. *Rubus fruticosus*. Elicitores. Ácido salicílico. Metil jasmonato. ramnoglucuronogalactana. Parede celular. Componentes extracelulares.

ABSTRACT

De MELLO, R. **Characterization of the extracellular compounds released from *Rubus fruticosus* (blackberry) cell during a hypersensitive response.** 2009. 105f. (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The plant-pathogen interactions trigger a series of signals that are not yet completely understood. One of the mechanisms is the hypersensitive response (HR), which is characterized by cell death in the infection site in order to prevent pathogen proliferation. Our previous studies with different elicitors demonstrated the correlation between the formation of reactive oxygen species (ROS) and cell wall degradation. Here, the cells were elicited with 1 $\mu\text{mol/L}$ **salicylic acid** (SA), **methyl jasmonate** (MeJA) or **acid polysaccharide** (rhamnoglucuronogalactan, F-I) (1 $\mu\text{mol/L}$) from characterization the extracellular components released and the modifications of the monosaccharide composition in cell wall during a hypersensitive response in *Rubus fruticosus* (blackberry-black). The extracellular proteins released to the extracellular were increased with the inducers molecules **F-I** and **MeJA**. The β -D-xylosidase enzymatic activities didn't change in the presence of **F-I**, **SA** and **MeJA**. The time-course curves for β -D-galactosidase, β -D-glucosidase activities in fraction E were most effective for **MeJA**, while **F-I** and **AS** inhibited β -D-galactosidase. Also, the **MeJA** has ability to activate laminarinase and chitinase enzymatic activities and inhibit galacturonase and α -L-fucosidase enzymatic activities. After 1h, the **SA** and **F-I** caused an increase galacturonase and chitinase activities and inhibited laminarinase enzymatic activity. Also, the time-course curves chitinase in the fraction increased with **SA**. The **F-I** and **SA** increased extracellular phenolic compounds, although they decreased them in the fraction I. **MeJA** was unable to change the synthesis of either intracellular or extracellular phenolic compounds. The data suggest that **F-I** and **AS** modulate the defense responses of plants through a via different that of **MeJA**. The extracellular reducing sugar didn't change with **F-I**, **SA** and **MeJA**. The **MeJA** was more effective in the release ROS incubation of 30 minutes at concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$. However, the presence of **SA** caused inhibition and **F-I** activated of ROS by cells. The main constituents of neutral sugars in the cell wall of *Rubus fruticosus* were glucose (55-61%), arabinose (22-29%) and mannose (13.8-15%). Minor constituents were fucose (0.65-1.2%), galactose (0.5-0.8%), xylose (0.5-0.8%) and rhamnose (~0.5%). **SA** decreased the rhamnose and fucose concentrations; **F-I** both decreased the percentage of mannose and glucose and increased rhamnose and fucose. **MeJA**, in turn, increased the percentage of rhamnose, xylose and galactose. The data suggest that **F-I** and **SA** modulate the defense responses of plants through a mechanism unrelated to the **MeJA** via. Since the **F-I** and the **SA** induced the release phenolic compounds and the **MeJA** increased in enzymatic activities, mainly age in the own plant cell wall. The **SA** and **F-I** were more effective in the increasing defense enzyme-related activity of the plant that acts on the walls of several phytopathogens, and the enzymes that can act in the cell wall of the plant were inhibited or did not change.

Keywords: Hypersensitive response. *Rubus fruticosus*. Elicitors. Salicylic acid. Methyl jasmonate. Rhamnoglucuronogalactan . Cell wall. Extracellular compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do estresse oxidativo com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	6
Figura 2. Esquema representativo da lamela média, da parede celular primária e da divisão da parede celular secundária.....	9
Figura 3. Esquema representativo da parede celular primária.....	10
Figura 4. Esquema representativo da parede celular primária do tipo I.....	14
Figura 5. Esquema representativo da parede celular primária do tipo II.....	14
Figura 6. Representação da Rota do Chiquimato.....	19
Figura 7. Representação da Rota do Octa-decanóides em células vegetais para a biossíntese do metil jasmonato (MeJA).....	22
Figura 8. Esquema representativo da ligação da quitina.....	24
Figuras 9. Representação estrutural do polímero de glucose em ligação glicosídica do tipo $\beta(1,3)$ e $\beta(1,6)$	25
Figura 10. Representação do protocolo experimental dos bioensaios de elicitação com células de <i>Rubus fruticosus</i> , seguido por análises das respostas de defesa induzidas.....	39
Figura 11. Liberação de ERO durante 30 minutos em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias na presença de F-I (1 $\mu\text{mol/L}$), AS (1 $\mu\text{mol/L}$) e o controle (H_2O).....	43
Figura 12. Liberação de ERO durante 30 minutos em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias na presença de MeJA (1 $\mu\text{mol/L}$) e o seu controle (DMSO).....	43
Figura 13. Produção de ERO após 30 minutos em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias na presença de F-I (1 $\mu\text{mol/L}$), AS (1 $\mu\text{mol/L}$) e o seu controle (H_2O).....	44
Figura 14. Produção de ERO após 30 minutos em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias na presença de MeJA (1 $\mu\text{mol/L}$) e o seu controle (DMSO).....	44
Figuras 15. Percentual dos monossacarídeos neutros de parede celular de células de <i>Rubus fruticosus</i> elicitadas com F-I, AS e MeJA. A) Representação de todos os monossacarídeos; B) Representação dos monossacarídeos encontrados em baixa concentração; C) Representação dos monossacarídeos encontrados em alta concentração.....	49
Figuras 16. Percentual dos monossacarídeos neutros de parede celular de células de <i>Rubus fruticosus</i> elicitadas com F-I, AS e MeJA. A) Representação de todos os monossacarídeos; B) Representação dos monossacarídeos encontrados em baixa concentração; C) Representação dos monossacarídeos encontrados em alta concentração.....	50
Figura 17. Concentração de açúcar redutor extracelular (Fração E). A fração E foi obtida da cultura de células de <i>Rubus fruticosus</i> elicitadas com F-I e AS (1 $\mu\text{mol/L}$) em relação ao controle (H_2O), com tempo de elicitação de 60 minutos.....	53

- Figura 18.** Concentração de açúcar redutor extracelular (Frações E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com MeJA (1 μ mol/L) em relação ao controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.....53
- Figura 19.** Concentração de compostos fenólicos totais extracelulares (Frações E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com F-I e AS (1 μ mol/L) em relação ao controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos.....56
- Figura 20.** Concentração de compostos fenólicos totais extracelulares (Frações E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com MeJA (1 μ mol/L) em relação ao controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.....56
- Figura 21.** Concentração de compostos fenólicos totais intracelulares (Frações I). A fração I foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com F-I e AS (1 μ mol/L) em relação ao controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos.....57
- Figura 22.** Concentração de compostos fenólicos totais intracelulares (Frações I). A fração I foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com MeJA (1 μ mol/L) em relação ao controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.....57
- Figura 23.** Concentração de proteínas totais extracelulares (Fração E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com F-I, AS (1 μ mol/L) e o controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos.....59
- Figura 24.** Concentração de proteínas totais extracelulares (Fração E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com MeJA (1 μ mol/L) e o controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.....59
- Figura 25.** Concentração de proteínas totais intracelulares (Fração I). A frações I foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com F-I, AS (1 μ mol/L) e o controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos.....60
- Figura 26.** Concentração de proteínas totais intracelulares (Fração I). A frações I foi obtida da cultura de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com MeJA (1 μ mol/L) e o controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.....60
- Figura 27.** Curva da atividade da enzima β -D-galactosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H₂O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.....63
- Figura 28.** Curva da atividade da enzima β -D-galactosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.....63
- Figura 29.** Representação percentual da velocidade enzimática da β -D-galactosidase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 μ mol/L em células de *Rubus fruticosus* correlacionada com o seu controle (H₂O e DMSO).....64
- Figura 30.** Curva da atividade da enzima β -D-glucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H₂O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.....66

Figura 31. Curva da atividade da enzima β -D-glucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	66
Figura 32. Representação percentual da velocidade enzimática da β -D-glucosidase extracelular. Foi obtida com o tratamento de 1h com o MeJA na concentração de 1 μ mol/L em células de <i>Rubus fruticosus</i> correlacionada com o seu controle (DMSO).....	67
Figura 33. Curva da atividade da enzima β -D-xilosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H ₂ O) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	69
Figura 34. Curva da atividade da enzima β -D-xilosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	69
Figura 35. Curva da atividade da enzima α -L-fucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H ₂ O) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	71
Figura 36. Curva da atividade da enzima α -L-fucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	71
Figura 37. Curva da atividade da enzima galacturonase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H ₂ O) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	73
Figura 38. Curva da atividade da enzima galacturonase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	73
Figura 39. Representação percentual da velocidade enzimática da galacturonase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 μ mol/L em células de <i>Rubus fruticosus</i> correlacionada com o seu controle (H ₂ O e DMSO).....	74
Figura 40. Curva da atividade da enzima laminarinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H ₂ O) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	76
Figura 41. Curva da atividade da enzima laminarinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	76
Figura 42. Representação percentual da velocidade enzimática da laminarinase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 μ mol/L em células de <i>Rubus fruticosus</i> correlacionada com o seu controle (H ₂ O e DMSO).....	77
Figura 43. Curva da atividade da enzima quitinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H ₂ O) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	79

Figura 44. Curva da atividade da enzima quitinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de <i>Rubus fruticosus</i> de 18 dias.....	79
Figura 45. Representação percentual da velocidade enzimática da quitinase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ em células de <i>Rubus fruticosus</i> correlacionada com o seu controle (H_2O e DMSO).....	80
Figura 46. Resumo dos efeitos dos elicitores empregados em cultura de células de <i>Rubus fruticosus</i> . A) F-I; B) AS.....	83
Figura 47. Resumo do efeito de MeJA empregado em cultura de células de <i>Rubus fruticosus</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de macro e microelementos utilizados para preparação do meio de cultura de <i>Rubus fruticosus</i>	33
Tabela 2. Número de células de <i>Rubus fruticosus</i> em 1g de massa úmida e massa seca.....	40
Tabela 3. Massa de parede celular de <i>Rubus fruticosus</i> obtida após os ensaios de elicitção.....	45
Tabela 4. Percentagem dos principais monossacarídeos neutros que constituem a parede celular de células de <i>Rubus fruticosus</i> cultivadas em suspensão, tratada com F-I, AS e MeJA e os seus controles (H ₂ O e DMSO).....	47
Tabela 5 - Avaliação por CLAE dos carboidratos componentes das frações extracelulares (Frações E).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

13-HPOT	ácido 13-hidroperóxido octadecatrienóico
aa	aminoácido
AL	ácido linolênico
$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
AJ	ácido jasmônico
AOX	enzima oxidase
APX	enzima ascorbato peroxidase
AS	ácido salicílico
ATP	trifosfato de adenosina
<i>Avr</i>	avirulência
BSA	soro albumina bovina
Ca^{2+}	íons de cálcio
CAD	enzima cinamil desifrogenase
CAT	enzima catalase
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes
Cu^{2+}	íon de cobre
DNA	ácido desoxirribonucléico
DIMBOA	diidroximetoxi-benzoxazinona
DMSO	dimetilsulfóxido
EC	código de classificação das enzimas
endoPG	enzima endopoligalacturonase
EGTA	ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay' (ensaio enzimático)
EPG	enzimas endopoligalacturonase
ERO	espécies reativas de oxigênio
exoPG	enzima exopoligalacturonase
FAL	enzima fenil alanina amônia liase
Fe^{3+}	íon de ferro
F-I	ramnoglucuronogalactana extraída do tegumento das sementes de paineira
Fração I	fração intracelular
Fração E	fração extracelular
GaIA	ácido galacturônico

GLC	cromatografia líquido-gasosa
GP	grau de polimerização
GSH	glutathione
GSH redutase	enzima glutathione redutase
GPRH	glicoproteína rica em hidroxiprolina
H ⁺	íons de hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HG	homogalacturonana
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HVA	ácido homovanílico
LOX	enzima lipoxigenase
MAPK	proteína quinase mitógeno-ativada
MeJA	metil jasmonato
MeAS	metil salicilato
MSC	meio de suspensão celular
NADPH oxidase	enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NaOH	hidróxido de Sódio
NO	óxido nítrico
O ₂ ⁻	radical superóxido
OGA	oligogalacturonídeos
·OH	radical hidroxila
OPC	oxo-pentenil-ciclopentanos
OPDA	ácido oxo-fitodienóico
PCD	morte celular programada
PAG	proteína ricas em arabinogalactana
pH	potencial hidrogeniônico
PGA	ácido poligalacturônico
PLA ₂	enzima fosfolipase A ₂
POX	enzima peroxidase
PPO	enzima polifenol oxidase
proteína-PR	proteína relaciona à patogênese
PRG	proteína rica em glicina
PRP	proteína rica em prolina
PRX	enzima peroxiredoxina
R	resistência

RG-I	ramnogalacturonana do tipo I de parede celular primária
RG-II	ramnogalacturonana do tipo II
RG	ramnogalacturonanas
RH	resposta de hipersensibilidade
RNA	ácido ribonucléico
RSA	resistência sistêmica adquirida
RSI	resistência sistêmica induzida
SOD	enzima superóxido dismutase
Tris	tris-hidroximetil aminometano
UI	unidade internacional
UV	ultravioleta
XET	enzima xiloglucana endotransglicosilase
XTH	enzima xiloglucana transglicosilase hidrolase
XXLGol	octassacarídeo reduzido de xiloglucana
NaBH ₄	boroidreto de sódio
CERMAV	Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales
UFPR	Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1- Espécies Reativas de Oxigênio.....	4
1.2- Compostos Antioxidantes.....	6
1.3- Parede Celular.....	8
1.3.1- Parede Primária.....	9
1.4- Moléculas Sinalizadoras em Plantas.....	15
1.4.1- Ácido Salicílico (AS).....	16
1.4.2- Ácido Jasmônico (AJ) e Metil Jasmonato (MeJA).....	20
1.4.3- Ramnoglucuronogalactana (F-I).....	23
1.5- Proteína-RP.....	23
1.5.1- Enzimas de Degradação de Parede Celular e Mecanismos de Defesa em Plantas.....	26
1.6- Amora-Preta (<i>Rubus fruticosus</i>) e Cultura de Células.....	30
2- OBJETIVOS.....	31
2.1- Objetivo Geral.....	31
2.2- Objetivos Específicos.....	31
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1- Equipamentos.....	32
3.2- Reagentes.....	33
3.3- Subcultura de Células <i>Rubus fruticosus</i>	33
3.4- Preparação das Células Cultivadas.....	33
3.4.1- Viabilidade e Contagem Celular.....	34
3.4.2- Análise da produção de ERO.....	34
3.4.3- Ensaios de Elicitação.....	34
3.4.4- Análise dos Componentes da Parede Celular.....	35
3.4.4.1- Determinação da Composição Monossacarídica da Fração P.....	35
3.4.4.1.1- Hidrólise Total dos Componentes da Parede Celular.....	35
3.4.4.1.2- Redução do Produto de Hidrólise.....	35
3.4.4.1.3- Acetilação do Produto de Hidrólise e Redução.....	36
3.5- Análise do Teor de Proteína na Fração Extracelular (Fração E) e Intracelular (Fração I).....	36
3.6- Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Extracelulares (Fração E) e Intracelulares (Fração I) Totais.....	36
3.7- Determinação do Teor de Açúcares Redutores Extracelulares (Fração E).....	37
3.8- Análise das Atividades Enzimáticas Extracelulares (Fração E).....	37
3.8.1- Extração e Quantificação das Proteínas.....	37
3.8.2- Ensaios das Enzimas β -D-Galactosidase, β -D-Glucosidase, α -L-Fucosidase e β -D-Xilosidase.....	37
3.8.3- Análise das Atividades Laminarinase, Quitinase e Galacturonase.....	38
3.9- Análise Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das Frações Extracelulares (Fração E).....	38

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1- Padronização das Condições Experimentais para o Estudo da Variação dos Componentes da Parede Celular.....	40
4.2- Efeito de F-I, AS e MeJA em Células de <i>Rubus fruticosus</i>	40
4.2.1- Análise da Produção de ERO	41
4.2.2- Análise dos Componentes da Parede Celular (Fração P).....	45
4.2.2.1- Análise e Quantificação dos Monossacarídeos da Parede Celular.....	46
4.3- Análise dos Componentes Liberados para o Meio Extracelular (Fração E) por Células de <i>Rubus fruticosus</i> Elicitadas com AS, F-I e MeJA.....	51
4.3.1- Determinação do Teor de Açúcares Redutores e Avaliação por CLAE dos Carboidratos Extracelulares (Fração E).....	51
4.3.2- Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Extracelulares (Fração E) e Intracelulares (Fração I) Totais.....	54
4.3.3- Determinação do Teor de Proteína Extracelulares (Fração E) e Intracelular (Fração I).....	58
4.3.3.1- Determinação das Enzimas da Fração Extracelular (Fração E).....	61
4.3.3.2- Análise da Atividade da β -D-Galactosidase.....	61
4.3.3.3- Análise da Atividade da β -D-Glucosidase.....	65
4.3.3.4- Análise da Atividade β -D-Xilosidase.....	68
4.3.3.5- Análise da Atividade α -L-Fucosidase.....	70
4.3.3.6- Análise da Atividade da Galacturonase.....	72
4.3.3.7- Análise da Atividade da β -(1-3)-Glucanase (Laminarinase).....	75
4.3.3.8- Análise da Atividade da Quitinase.....	78
5- CONCLUSÕES.....	81
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A resistência de plantas ao ataque de fitopatógenos é a capacidade das plantas em desenvolverem estratégias que impedem, restringem ou retardam a penetração destes organismos em seus tecidos, diminuindo os efeitos danosos potenciais. As plantas sofrem sucessivas agressões de fatores bióticos, como vírus, bactérias, insetos e outros organismos. São cada vez mais agredidas por fatores abióticos, decorrentes do aumento da poluição do ar, do solo e da água, sendo que os produtos tóxicos presentes em rejeitos industriais e domésticos alteram o ambiente, gerando fenômenos locais, como chuvas ácidas, e até globais, como o efeito estufa (aumento gradual da temperatura atmosférica) (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O metabolismo da célula vegetal sofre profundas alterações para se adaptar ao meio em que vive (DANGL et al., 2000) e seu mecanismo de resposta a danos e doenças é acionado assim que reconhece a agressão (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; PASCHOLATI; LEITE, 1995). O elaborado sistema de defesa e adaptação das plantas pode atuar de duas formas. A primeira, a **resistência constitutiva**, é composta pelos mecanismos de defesa **pré-formados**, ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores. É recebida por herança dos ancestrais e torna as plantas imunes (ou não-hospedeiras) à maioria dos patógenos. Os mecanismos pré-formados estão presentes nas plantas antes do ataque patogênico, podendo ser estruturais, como espinhos, tricomas, cutícula ou substâncias relacionadas à defesa química (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Destacando-se os compostos fenólicos, terpenóides e algumas enzimas, tais como β -1,3-glucanases e quitinases. Esses fatores podem ser suficientes para prevenir a colonização de tecidos vegetais (SHEWRY; LUCAS, 1997; HEATH, 2000; GERSHENZON, 2002).

Caso ocorra a penetração do agressor o sistema de defesa, denominado **resistência induzida**, é ativado, produzindo mecanismos **pós-formados**. Esses mecanismos são papilas, lignificação e fitoalexinas, entre outros. Podendo ser classificados como **resistência localizada**, ativada no ponto onde ocorre à agressão, e a **resistência sistêmica adquirida**, que protege a planta contra ataques subseqüentes (PASCHOLATI; LEITE, 1995; SHEWRY; LUCAS, 1997).

O mecanismo de reconhecimento planta-patógeno, conhecido como '**teoria gene-a-gene**', foi proposto por Flor, em 1955, que sugere um sistema de reconhecimento planta-patógeno como uma interação específica. Um patógeno com o gene dominante de avirulência (*Avr*) correspondente com um gene da planta dominante de resistência (*R*). O produto do gene

Avr do patógeno não é capaz de provocar doença na planta, se a planta tiver o gene *R* apropriado (**interação incompatível**). Quando a planta não possui o gene adequado, não há reconhecimento nem resistência, tornando o patógeno virulento (**interação compatível**) (FLOR, 1955).

Para ocorrer a resistência induzida, a planta necessita reconhecer a presença do microrganismo agressor e, conseqüentemente, transmitir os sinais para a ativação dos mecanismos de defesa. Esse reconhecimento é adquirido devido à presença de moléculas indutoras das respostas, chamadas de **elicitores** (GOMEZ-GOMEZ et al., 2002, HAMMOND-KOSACK; PARKER, 2003; PARKER et al., 2003, NURNBERGER; SCHEEL, 2001) que são capazes de se ligar às moléculas receptoras encontradas provavelmente na membrana celular. Além disso, essas moléculas difundem-se nos tecidos da planta, perto da infecção e em tecidos distantes, desencadeando outras respostas de defesa, destacando-se a resistência sistêmica adquirida (RSA) (DURRANT; DONG, 2004; LUCAS, 1998).

Estudos que compararam espécies de milho resistentes à infecção pelo fungo *Exserohilum turcicum*, que causa a helmintosporiose ou mancha-marrom, com as espécies de milho suscetíveis ao agente, demonstraram que as espécies de milho com menor resistência à doença apresentaram atraso na ativação do seu mecanismo de defesa, aparecendo os sintomas da doença. Tal fato comprovou a importância da rapidez e magnitude necessária para a ativação do sistema de defesa da planta durante a expressão da resistência (SHIMONI et al., 1991).

A **resposta de hipersensibilidade** (RH) é uma das principais respostas de defesa encontrada nas plantas e seus eventos celulares iniciam-se imediatamente após o primeiro contato do patógeno com a planta (STICHER et al. 1997).

A HR é caracterizada pela morte das células situadas no local de contato do agressor com a célula vegetal. Com isso, a planta impede o acesso do patógeno às células vizinhas, limitando a infecção (GOODMAN; NOVACKY, 1994; SCHENK et al., 2000). Apesar desse evento não estar claramente esclarecido, sugere-se que o primeiro sinal que ocorre é a despolarização da membrana plasmática e o fluxo de íons que é mediado por proteína G. De um modo geral, ocorre influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) para o citoplasma, via ativação de canais de cálcio e, simultaneamente, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células (MATHIEU et al., 1991).

O aumento do Ca^{2+} intracelular provoca o aumento da atividade das enzimas peroxidase de parede celular e da NADPH oxidase de membrana e conseqüentemente gera espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao aumento rápido e transitório de agentes

oxidantes e a destruição de compartimentos (ALLAN; FLUHR, 1997; ANDI et al., 2001; LAMB; DIXON, 1997).

Este fluxo de íons provoca a indução de proteína-quinase mitógeno-ativadas (MAPKs) que é translocada para o núcleo e várias proteínas são rapidamente fosforiladas e desfosforiladas. Sabe-se que ocorre acúmulo de ácido salicílico (AS) e a geração de ERO, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), já que AS inibe a catalase que é responsável para a transformação de H_2O_2 em H_2O e O_2 (ALLAN; FLUHR, 1997; BREUSEGEM et al., 2001; LAMB; DIXON, 1997).

Além disso, na RH ocorre o espessamento das paredes celulares e da cutícula (fina camada sobre a epiderme do caule e das folhas), a síntese de toxinas (fitoalexinas) e proteínas relacionadas à defesa (proteínas-PR) (SCHENK et al., 2000), não ocorrem ataques subsequentes por fitopatógenos na célula vegetal (BUCHANAN et al., 2000).

Uma das respostas mais características, que ocorre poucas horas após o reconhecimento do invasor, é o aumento da produção ERO. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é o principal composto formado, que está envolvido tanto na morte do patógeno por ação direta e/ou na indução da HR. Paralelamente, ocorre o aumento da síntese e liberação de compostos fenólicos e produção aumentada de lignina (BARRETO, 2005).

Existem evidências que tratamentos com ERO mimetizam a RH provocada por patógeno incompatível. As diferenças nas respostas provocadas por ERO na RH devem ser concentração dependente, sendo que alta concentração provoca a morte celular, enquanto baixa concentração deve estar envolvida na sinalização, como na transcrição de genes responsáveis pela codificação de proteínas antioxidantes (BUCHANAN et al., 2000).

Estudos realizados com o fungo *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*), que é responsável pela doença da brusone em gramíneas, sendo caracterizada pela formação de pequenas lesões necróticas, de coloração marrom, que evoluem, aumentando de tamanho, tornando-se elípticas, com margem marrom e centro cinza ou esbranquiçado, mostram mudanças metabólicas durante a infecção. Idênticas mudanças metabólicas ocorreram durante a infecção de *Magnaporthe grisea* em cevada, arroz e uma gramínea chamada *Brachypodium distachyon*. Em tecidos pré-sintomáticos ocorreu o acúmulo de malato e poliaminas, ao invés de ser gerado ERO para a defesa do hospedeiro e o nível de metabólitos associados diminuição de estresse redox, em diferentes compartimentos celulares, aumentou dramaticamente. A atividade da enzima NADP-málica e geração de ERO foram observados nos locais da infecção do patógeno e ambos foram suprimidos em interação compatíveis. Ocorreu desvio do percurso do chiquimato para produzir quinato, bem como a acumulação de

precursores do polímero de lignina. Isso nos mostra a modulação do metabolismo fenilpropanóides na defensiva por *Magnaporthe grisea* e da incapacidade das espécies hospedeiras para gerar RH ou produzir papilas lenhificadas (ambos envolvendo ERO) para restringir a invasão do patógeno (PARKER et al., 2009).

1.1- Espécies reativas de Oxigênio

Um fenômeno comum em resposta ao estresse ou à presença de patógeno como manifestação oxidativa é a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são geradas a partir do oxigênio molecular (O_2). Essas substâncias tóxicas são formadas principalmente durante funções metabólicas normais, nos peroxissomos ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as plantas estão constantemente expostas (MITTLER, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (Figura 1) são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura, fazendo com que reajam avidamente com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos, alterando suas funções (DRÖGE, 2002).

O estresse oxidativo é decorrente do desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resultam na indução de danos celulares pelos radicais livres. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente, é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999; DOKE; MUIRA, 1995; EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005).

Provalvemente a primeira reação que ocorre com a redução de O_2 produz radicais de vida curta, os superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) que são incapazes de atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde são gerados, sendo dismutados a peróxidos. Quando essa inversão não ocorre, o radical superóxido pode reduzir quinonas e complexos metálicos de transição de Fe^{3+} e Cu^{2+} , afetando a atividade de metaloenzimas (NEILL et al., 2002).

Os cloroplastos e as mitocôndrias são organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com fluxo de elétrons sustentado, sendo pontos de produção de ERO na célula. Trabalhos sugerem que a mitocôndria pode ser uma organela que gera ERO sobre estresses específicos. Os eventos da fotorrespiração nos peroxissomos é uma forma de produção de H_2O_2 (BREUSEGEM et al., 2001).

O oxigênio é altamente reativo durante sua redução até água na cadeia respiratória. Uma pequena parcela dos elétrons que escapam da cadeia respiratória pode reduzir o oxigênio

molecular (O_2), formando os radicais livres. As principais formas de ERO são o oxigênio singlete (1O_2), o íon superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CHANDRU et al., 2003; SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002).

No cloroplasto, as espécies reativas são formadas através do O_2 liberado na fotossíntese, o qual sofre a ação de enzimas oxidases e peroxidases que se encontram na membrana plasmática. A ativação dessas enzimas desencadeia a resposta de hipersensibilidade e a destruição do patógeno. As moléculas mensageiras formadas, O_2^- e H_2O_2 , apesar de serem uma ameaça às plantas em alta concentração, funcionam como parte de uma rota de transdução de sinais que levam à indução de defesa ao patógeno e à morte celular programada (PCD) (FOYER; NOCTOR, 2003).

Os peróxidos de hidrogênio são capazes de percorrer longas distâncias do local onde são produzidos, podendo afetar outros compartimentos (VRANOVÁ et al., 2002). Eles induzem a formação de ligações transversais na parede celular, o fechamento de estômatos, a expressão de genes relacionados à defesa das plantas, auxiliam na ativação da via dos fenilpropanóides e no fluxo de íons, biogênese de peroxissomos, ativam enzimas como as catalases, peroxidases, glutathione S-transferase e inativam a enzima superóxido dismutase e danificam ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, além de participar do processo de RH (NEILL et al., 2002).

O radical OH é o ERO mais reativo, porém com meia vida muito curta, podendo reagir com quaisquer moléculas presentes nas células (CHANDRU et al., 2003). As células não produzem enzimas capazes de eliminar esse radical, ocorrendo assim, em alta concentração e provocando a morte celular (VRANOVÁ et al., 2002).

Para controlar as espécies reativas de oxigênio as células vegetais apresentam um sistema de defesa antioxidante enzimático que inclui, como principais enzimas, as **superóxido dismutases** (SOD) e as **peroxidases** (POX), que removem os radicais superóxido e peróxido, respectivamente (HERNÁNDEZ et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2006). Outras enzimas antioxidantes também estão presentes nas plantas, como por exemplo: a **ascorbato peroxidase** (APX), **glutathione redutase** (GSH), **peroxiredoxina** (tioredoxina peroxidase, Prx), **catalase** (CAT) e **polifenol oxidase** (PPO) (SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002). As células também utilizam sistemas antioxidantes não-enzimáticos como: o ácido ascórbico (vitamina C), glutathione (GSH) e carotenóides, que ocorrem em alta concentração nas plantas (SLESÁK et al., 2002).

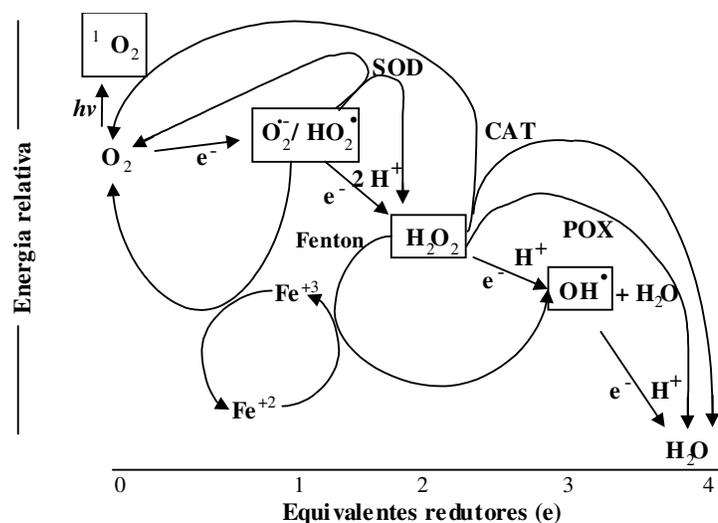


Figura 1. Esquema representativo do estresse oxidativo com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (adaptado de BAKER; ORLANDI, 1999).

1.2. Compostos Antioxidantes

As plantas possuem vias metabólicas que sintetizam substâncias que não estão envolvidas em processos vitais, com estruturas químicas muito variadas e às vezes muito complexas, conhecidas como metabólitos secundários. Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e composto que contém nitrogênio, comumente chamados de alcalóides (GERSHENZON, 2002).

Esses compostos participam da defesa da planta contra patógenos (SUDHAKAR et al., 2007), por possuírem função alelopática que impede o crescimento de plantas vizinhas competidoras, além de participarem da composição da parede celular, provocando o fortalecimento dessa parede. Os fenólicos também permitem a condução de água e sais minerais pelo xilema, que auxilia na adaptação de plantas em clima seco, confere pigmentos às plantas e produzem substâncias antimicrobianas como as fitoalexinas (LUZZATTO et al., 2007; MILBURY et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2002).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esses compostos químicos pertencem a um grupo heterogêneo com aproximadamente 10.000 compostos. São biossintetizados por diversas rotas metabólicas, porém a maioria dos compostos é sintetizada por meio da via do acetato/malonato, do acetato/mevalonato e do chiquimato (via do ácido

chiquímico) e acumulam-se nos vacúolos das células vegetais (HERMANN; WEAVER, 1999).

A classe mais abundante de compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, por meio da reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase que é situada num ponto chave entre o metabolismo primário e secundário, forma o ácido cinâmico por meio da eliminação de uma molécula de amônia. A invasão de patógenos desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que é responsável por codificar a enzima fenil amônia liase (FAL), conseqüentemente aumenta sua atividade e a síntese de compostos fenólicos (GERSHENZON, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A via do fenilpropanóide sintetiza uma variedade de compostos fenólicos que convertem carboidratos simples, derivados da glicólise e da via das pentoses fosfato, em aminoácidos aromáticos (HERMANN; WEAVER, 1999). Eles apresentam diferentes funções nas plantas, como antioxidantes, agentes antimicrobianos, pigmentos coloridos e polímeros, suberinas e ligninas como constituintes estruturais (SARMA et al., 1998).

A atividade antioxidante desses compostos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio tripleto e singleto ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os fenóis são produzidos em células especializadas distribuídas pelos tecidos ou em locais estratégicos. As enzimas dessas sínteses são associadas ao retículo endoplasmático, o que permite que, logo após a produção, esses compostos sejam armazenados em vesículas, na sua forma original ou glicosilada (ISAAC, 1992; HRAZDINA, 1994). Entretanto, quando em estado livre nas células são tóxicos e rapidamente são oxidados pela ação das peroxidases.

Beckman (2000) sugeriu que a oxidação ou polimerização é obtida por intermédio de H^+ -ATPases. Geralmente a concentração de H^+ no interior do vacúolo é significativamente mais alta do que no citoplasma, o que permite manter os grupos hidroxil dos compostos fenólicos em um estado não ionizado no interior vacuolar. Portanto, permanecem na forma reduzida em compartimentos intracelulares. Com o reconhecimento da planta ao patógeno, os fenóis são descompartimentalizados e provocam a RH.

A compartimentalização foi comprovada em um estudo realizado com raízes de banana (*Musa acuminata* L.), demonstrando que os compostos fenólicos ficam armazenados em células especializadas (células de tanino) distribuídas no parênquima do xilema na forma de dopamina (MACE et al., 1963).

Durante a infecção, os compostos fenólicos agem como agente antimicrobiano, retardando o crescimento do agressor e permitem o controle dos ERO com sua atividade

antioxidante. A parede celular é modificada por substituintes fenólicos ou deposição de papilas, formando uma barreira física que impede a penetração do invasor (BARRETO, 2005).

Compostos extraídos de amora-preta (gênero *Rubus*), por exemplo, já demonstraram grande potencial para remover radicais livres, diminuindo a oxidação lipídica da membrana (DEIGHTON, 2000; HEINONEN et al., 1998). Honner (1988) comprovou o efeito do estresse abiótico, como a temperatura, na alteração da concentração de metabólitos secundários. Ele observou que plantas que cresciam expostas ao sol aumentavam até três vezes a produção de taninos quando comparado a plantas cultivadas sob sombreamento.

Em clones resistentes de cacaueteiro contra o fungo *Crinipellis perniciosa* observaram altos valores de fenóis, sugerindo o envolvimento desses compostos na resistência constitutiva, já que a concentração de compostos fenólicos em tecidos infetados era maior em relação a tecidos saudáveis (NOJOSA, et al., 2003).

1.3. Parede Celular

A parede celular é responsável pela forma da célula, resiste à pressão interna, controla a velocidade e a direção do crescimento, participa do transporte intercelular, do armazenamento de material de reserva, da sinalização e do reconhecimento entre diferentes células, sendo fundamental seu papel na proteção contra patógeno (CARPITA; McCANN, 2000; WILSON et al., 2000). Além de participar da fotossíntese com a incorporação da maior parte do carbono que participa desse processo nos polímeros que constituem a parede celular das plantas (CARPITA; McCANN, 2000).

A parede celular é composta, principalmente por polissacarídeos como **hemiceluloses**, **compostos pécticos (pectinas)** e em maior quantidade de **celulose**, entre outros compostos que vão sofrendo alterações ao longo da vida das células (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em geral, a morfologia da parede celular de uma célula vegetal é composta por três regiões distintas: a **lamela média**, **parede primária** e **parede secundária** (Figura 2) (CARPITA; McCANN, 2000; RAVEN et al., 2001). Sua composição molecular varia de uma planta para a outra e a alteração na espessura da parede depende do estágio de desenvolvimento da célula. Após o crescimento, muitas células depositam material adicional em sua parede formando a parede celular secundária (RAVEN et al., 2001).

A lamela média é a interface entre as paredes primárias das células vegetais, ou seja, região de intersecção entre duas células de um tecido vegetal (CARPITA; McCANN, 2000) e possui alta quantidade de pectinas e diferentes proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Pectinas são os polissacarídeos mais abundantes encontrados na lamela média onde eles regulam a adesão intercelular, apresentando característica de um agente cimentador entre as células vizinhas de um tecido vegetal (BOLWELL, 1993; MOORE et al., 1986). Morfologicamente se distingue das pectinas encontradas na parede primária por apresentarem menor grau de ramificação de cadeias curtas (SELVENDRAN, 1985).

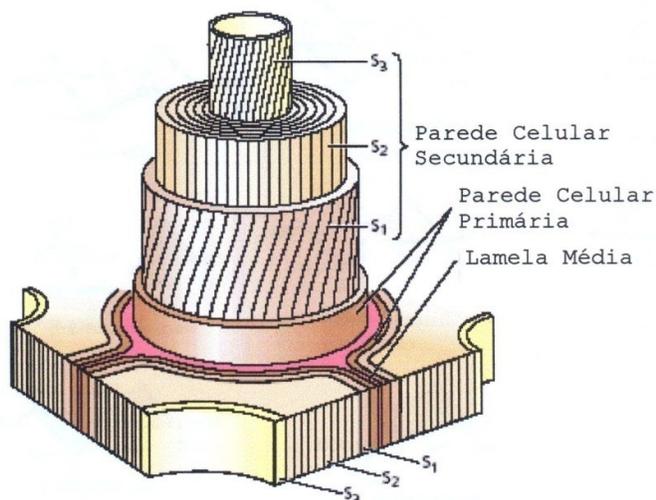


Figura 2. Esquema representativo da lamela média, da parede celular primária e da divisão da parede celular secundária (adaptado de TAIZ; ZEIGER, 2004).

1.3.1. Parede Primária

Parede celular primária é uma fina camada produzida a partir da divisão celular. É caracterizada por ser delgada e flexível, podendo se moldar para acompanhar o desenvolvimento das células no decorrer de seu crescimento. A estrutura geral da parede primária é composta por uma rede de celulose e hemicelulose embebida em uma matriz de polissacarídeos pécnicos e, em menor quantidade, de proteínas e lipídeos (1-10%) depositados em ambos os lados da lâmina. Sua composição varia conforme o tipo de tecidos e órgãos (HAYASHI, 1989; CARPITA; McCANN, 2002; COSGROVE, 2005; JARVIS; McCANN, 2000; RAVEN et al., 2001 CARPITA; GIBEAUT, 1993).

A parede celular primária é constituída por duas interfases, uma fase mais homogênea denominada de microfibrilar e a outra matricial, sendo mais heterogênea. A fase microfibrilar é assim chamada por ser composta por microfibrilas que são estruturas longas e finas constituídas por moléculas de celulose associadas entre si por ligação de hidrogênio e

alinhadas paralelamente com as diversas microfibrilas presentes nessa fase da parede, sua disposição dá resistência e suporte à parede celular. Podem-se encontrar zonas amorfas em que as fibras de celulose não têm orientação regular. A celulose é o composto orgânico mais abundante do mundo (FRY, 1988; ENGLEHARDT, 1995; FRY, 1989; SJÖSTRÖM, 1981), que constitui 20 a 30% das paredes celulares primárias e 40% das paredes celulares secundárias (FRY, 1989). É um polímero linear de alta massa molecular constituído por unidades monoméricas de β -D-glucose formando as microfibrilas de celulose ligadas $\beta(1-4)$.

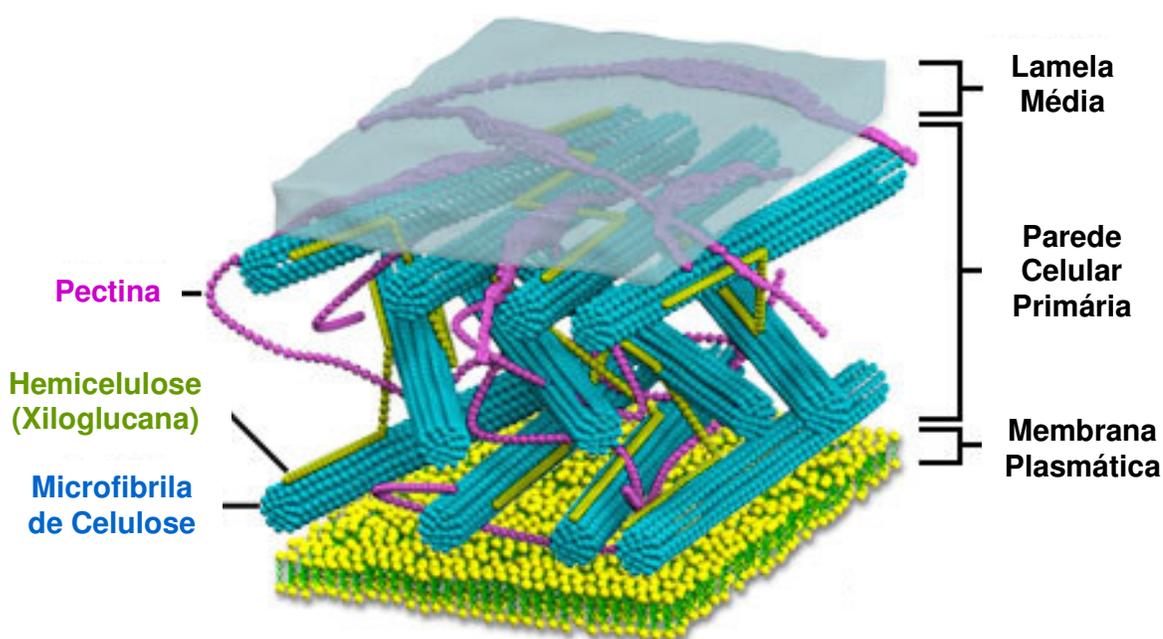


Figura 3. Esquema representativo da parede celular primária (adaptado do site <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>).

A fase matricial consiste de uma variedade de polissacarídeos (hemiceluloses), glicoproteínas e compostos pécticos (pectinas), variando a sua composição com as diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular (ROLAND et al., 1992).

As hemiceluloses apresentam um grau de polimerização menor que a rede de celulose, sendo formadas por cadeias mais curtas e bastante ramificadas (BROWING, 1963) que se unem à rede de celulose pelas ligações de ponte de hidrogênio (FRY, 1989). Esses polímeros são responsáveis pelo aumento da flexibilidade da parede celular, participando da regulação do crescimento e desenvolvimento do vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989; LIMA, 2002).

As pectinas são a família mais complexa de polissacarídeos. Em geral, são compostas por cadeias lineares de ácido D-galacturônico (GalA) (WILLATS et al., 2001) em ligação β -(1-4), podendo ou não estar interrompidas por unidade de L-ramnose em ligação β -(1-2). As cadeias laterais são compostas principalmente por arabinose e galactose; zonas muito e pouco ramificadas coexistem na mesma molécula (DE VRIES et al., 1982).

Alguns polissacarídeos pécticos possuem estrutura primária relativamente simples, como a homogalacturonana (HG), que apresenta uma cadeia linear de ácido galacturônico (GaIA) (cerca de 200 unidades) que podem se unir pelas ligações cruzadas com íon cálcio (Ca^{2+}), formando uma rede entre as cadeias. O acúmulo do composto inorgânico cálcio (Ca^{2+}) facilita a ligação entre os polímeros de pectina aumentando sua resistência (CARPITA; McCANN, 2000; FRY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os HG podem representar até 60% da pectina em uma parede primária (ONEILL et al., 1990). As enzimas que fragmentam HG (endo e exo poligalacturonases e liases) são secretadas por muitos patógenos de plantas. Esses fragmentos de oligogalacturonídeos apresentam função na indução do mecanismo de defesa da planta (RIDLEY et al., 2001).

As paredes celulares contêm diferentes proteínas que pode desempenhar papel estrutural, de reconhecimento e catalítico, sendo que a maioria delas são glicosiladas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Sua classificação se baseia na sua composição (CARPITA; McCANN, 2000), distinguindo das proteínas citoplasmáticas por serem ricas em hidroxiprolina (GPRHs), em glicina (PRG) ou rica em prolina (PRP) (CASSAB, 1998).

Outro grupo de proteína em que a hidroxiprolina também é abundante é a proteína rica em arabinogalactana (PAG). Na sua maioria ocorre nos espaços intercelulares, sendo presente em menor quantidade na parede celular (FINCHER et al., 1983).

O primeiro modelo de parede celular primária foi proposto por Albersheim, onde as xiloglucanas (hemicelulose) estariam ligadas a microfibrilas de celulose pelas ligações de hidrogênio, enquanto que ligações covalentes existiriam na matriz de xiloglucanas, pectinas e glicoproteínas (KEEGSTRA et al., 1973). Em 1989, Fry propõe que os polissacarídeos pécticos e as proteínas participariam, independentemente, do envolvimento do complexo celulose-xiloglucana de maneira não covalente.

Carpita e Gibeaut (1993) elaboraram um modelo de parede celular primária subdividindo-as em 2 tipos estruturais. A parede do **tipo I** (Figura 4) que inclui as paredes de plantas eudicotiledôneas e a parede do **tipo II** (Figura 5) que engloba algumas monocotiledôneas.

As paredes do **tipo I** são formadas por uma rede de celulose composta por microfibrilas de celulose que apresentam uma largura de 5 a 15 nm, sendo espaçadas de 20 a 40 nm. Essas microfibrilas são enoveladas entre si e entrelaçadas pelas cadeias das hemiceluloses. Como a principal hemicelulose desse tipo de parede temos as xiloglucanas, podendo também ser encontradas em menor quantidade as hemiceluloses: (galacto)glucomananas, galactomananas, (1-3) β -D-glucanas e glucuronoarabinosilanas (CARPITA; GIBEAUT, 1993; CARPITA, 1996).

As xiloglucanas constituem 20% da parede celular primária das eudicotiledôneas (McNEIL et al., 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989), apresentando como cadeia principal β -D-glucose com ligações (1-4), sendo que 75% das unidades da cadeia de glucose são substituídas α -D-xilose com ligações (1-6). Além da xilose, as unidades da cadeia de glucose podem ser substituídas por galactose ou fucose em O-2 (FRY, 1989; HAYASHI, 1989; CARPITA; McCANN, 2000).

As ligações das xiloglucanas com a rede de celulose se dão por ponte de hidrogênio e são responsáveis pela união das microfibrilas de celulose adjacentes (FRY, 1989; HAYASHI, 1989; WHITNEY et al., 1999). As ligações entre xiloglucanas e celulosas são quebradas por enzimas endolíticas durante o crescimento celular, permitindo a extensão celular (DARVILL et al., 1992; WHITNEY et al., 1995). A remoção da xiloglucana da rede de celulose pode causar um colapso nas microfibrilas de celulose, fazendo com que estas percam o espaçamento e a orientação provocando o afrouxamento para o crescimento celular (McNEIL et al., 1984; YORK et al., 1984; HAYASHI, 1989).

As xilanas são encontradas em menor quantidade na parede primária (5%) constituindo a principal hemicelulose da parede secundária (20%). Estão interconectadas nas microfibrilas de celulose e lignina (HATFIELD et al., 1999).

A cadeia linear das xilanas é composta pelos monossacarídeos de D-xilose unidos pelas ligações glicosídicas do tipo β (1-4), podendo ser substituídas por unidades de ácido O-metilglucurônico, ácido glucurônico, acetil e arabinose (FRY, 1989; O'NEILL, 2003).

A parede do **tipo I** é embebida em uma matriz péctica, que apresenta como principais constituintes as homogalacturonanas e ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I). As RG-I são constituídas pelo dissacarídeo repetitivo formado por ácido galacturônico (α -D-GalAp) e ramnose (α -L-Rhap). Raramente são encontradas ramnogalacturonanas do **tipo II**. A RG II que é altamente ramificada e muito variável, ou seja, pode conter mais de 10 diferentes monossacarídeos em sua cadeia (CARPITA; McCANN, 2000; FRY, 2004; TAIZ; ZEIGER,

2004). As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, também chamadas de extensinas, são incorporadas na parede celular primária do tipo I (KEEGSTRA et al., 1973).

A matriz de pectina presente na parede primária fornece um preenchimento hidrofílico formando uma fase gel hidratado (CARPITA; McCANN, 2000; FRY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004) que envolve as ligações cruzadas de celulose-xiloglucana (CARPITA; GIBEAUT, 1993), impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose (CARPITA; McCANN, 2000; FRY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

As paredes do **tipo II** distinguem-se das paredes do **tipo I**, principalmente pela presença das cadeias de glucuronoarabinosilanas, como principal hemicelulose, encontrada interconectada com a microfibrila de celulose. As pectinas da parede do **tipo II** apresentam cadeia principal composta por unidade de ácido galacturônico intercalado por unidade de ramnogalacturonana do tipo I (RG-I) e suas cadeias laterais são compostas por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas (McNEIL et al., 1984; BACIC et al., 1988; CARPITA; GIBEAUT, 1993).

As principais proteínas encontradas na parede do **tipo I** são as extensinas, que são proteínas ricas em hidroxiprolina (GPRH) (CARPITA; McCANN, 2000). A maior parte das unidades de hidroxiprolina são glicosiladas, contendo de 1 a 4 unidades de arabinose. Algumas unidades de serina são glicosiladas com uma única molécula de galactose (COSGROVE, 2005; STUART; VARNER, 1980; LEACH et al., 1982; MELLON; HELGESON, 1982; SMITH et al., 1984, 1986; VAN HOLST; VARNER, 1984; CASSAB et al., 1985; STAFSTROM; STAEHELIN, 1986; BIGGS; FRY, 1990; KAWASAKI, 1991).

A classe de proteína rica em glicina (PRG) é caracterizada por conter até 70% de glicina. Sugere-se que existam, pelo menos, duas grandes classes de PRG. Uma classe é encontrada na parede celular, enquanto a segunda classe é encontrada no citoplasma e é regulada por uma variedade de condições de estresse. As proteínas da classe de PRG são encontradas tanto em parede do **tipo I** como do **tipo II** (KELLER et al., 1989b).

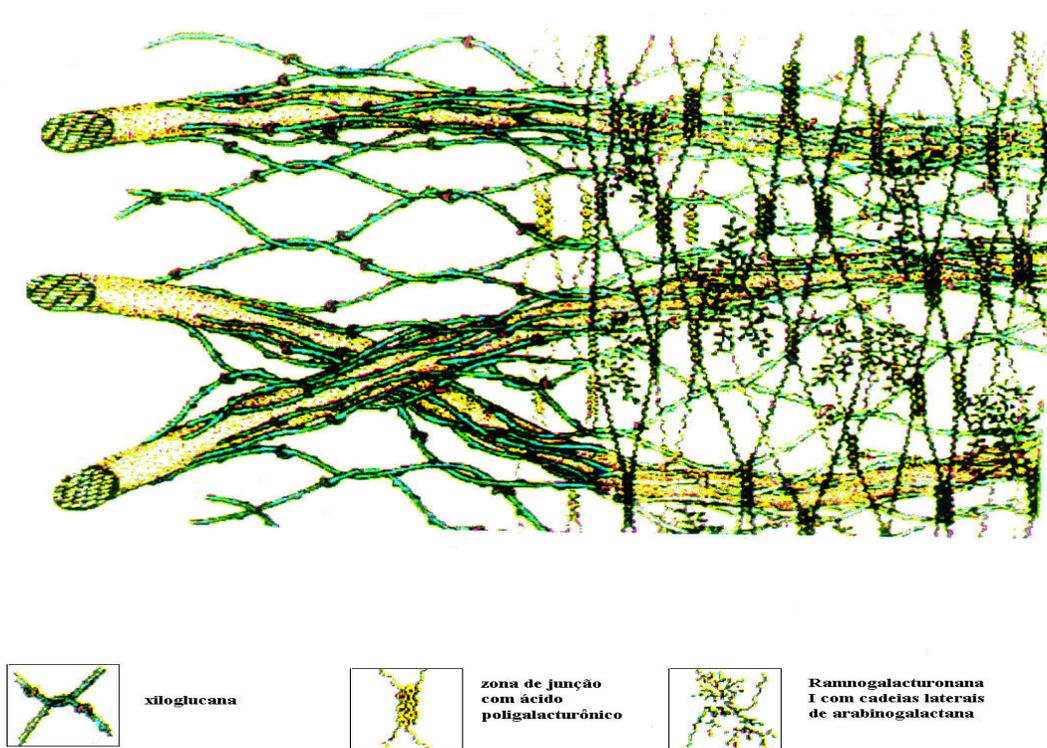


Figura 4. Esquema representativo da parede celular primária do tipo I (adaptado de CARPITA; GIBEAUT, 1993).

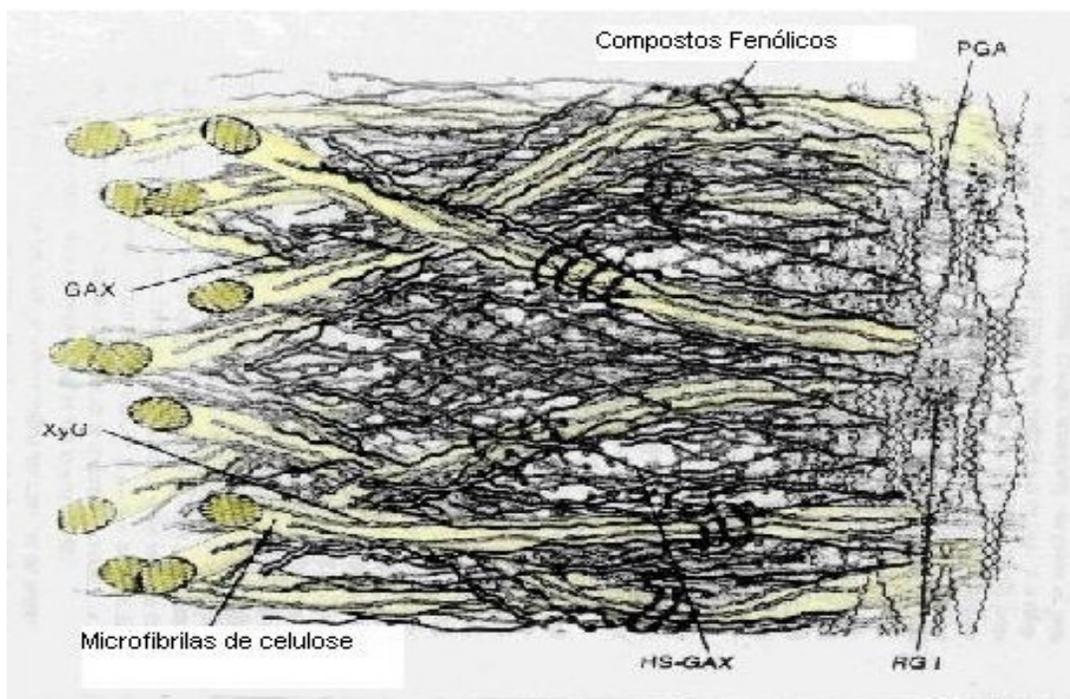


Figura 5. Esquema representativo da parede celular primária do tipo II (adaptado de CARPITA, 1996).

1.4. Moléculas Sinalizadoras em Plantas

A presença de um microorganismo invasor é detectada pela planta pelas moléculas secretadas (elicitores) pelo próprio patógeno. Além disso, outros pequenos compostos têm a função de ativar o sistema de sinalização da planta, como o **ácido salicílico (AS)** e o **metil jasmonato (MeJA)** (ALVARES, 2000; RAO et al., 2000; SHIBUYA; MINAMI, 2001; SILIPO et al., 2005).

Os elicitores são moléculas que possuem estruturas químicas muito diversificadas, como (poli) peptídeos, glicoproteínas, lipídeos, poli e oligossacarídeos (NURNBERGER; SCHEEL, 2001), Estes últimos são bem caracterizados (DARVILL; ALBERSHEIM, 1984) e desencadeiam uma cascata de sinais que irá resultar na ativação de diversos mecanismos de defesa na planta infectada (GÓMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2002; NURNEBERGER; SCHEEL, 2001; YAMAMIZO et al.; 2006).

Podem ser derivados dos fitopatógenos (exógenos) como também da parede celular da própria planta (endógenos) (UMEMURA et al., 2002). Os elicitores endógenos surgem devido à ação de enzimas hidrolíticas associadas ao microorganismo invasor que pode liberar fragmentos da parede celular das células vegetais (EBEL et al., 1997).

Os oligogalacturonídeos (OGA) exibem diversas atividades sinalizadoras em células vegetais que catalisam uma série de sinais que englobam os mecanismos de defesa da planta. Muitos trabalhos investigam os efeitos sinalizadores dos elicitores, tais como a indução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SHAW; LONG, 2003), as mudanças na expressão de genes que resultaria na produção de proteínas de defesa (BERGEY et al., 1999), a síntese de compostos secundários e fitoalexinas.

Os fungos produzem enzimas, como a endopoligalacturonases (EPG) que agem nas paredes celulares das plantas, liberando fragmentos pécticos que funcionam como elicitores provocando o aumento da síntese de fitoalexinas (compostos de baixa massa molecular com atividade microbicida) (SILVA; BRAGA, 2004). Os oligossacarídeos elicitores obtidos pela ação de enzimas hidrolíticas sobre xiloglucanas são capazes de regular o crescimento celular, a morfogênese e indução de inibidores de proteinases (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Os elicitores melhor caracterizados são as β -glucanas, derivadas de laminarinas e de exopolissacarídeos, derivados também da quitina (parede celular de fungos) e os polissacarídeos de pectinas, por exemplo, o OGA, originados da parede celular de plantas (AYERS et al., 1976a,b,c; SHARP et al., 1984; WALKER-SIMMONS et al., 1983).

Os resultados dos estudos de Reymond e colaboradores (1995), que estabelece a habilidade dos OGA com grau de polimerização (GP) igual ou maior a 20 em induzir a

fosforilação de proteínas *in vitro*, indicam que o tamanho ideal de OGA com capacidade elicitora, pode refletir mais na sensibilidade do OGA do que na especificidade de reconhecimento pelo seu receptor.

Entre os oligogalacturonídeos obtidos *in vitro*, por hidrólise ácida de polissacarídeos pécticos ou por tratamento com enzimas pécticas, aqueles que apresentam fragmentos com GP de 10 a 12 unidades possuem maiores atividades elicitoras (SHIBUYA; MINAMI, 2001). O processo de encurtamento dos elicitores pela ação da enzima endopoligalacturonases (Endo-PG) sobre a cadeia do homogalacturonana é limitado a GP de 2-4 (SILVA; BRAGA, 2004).

Foi verificado por VARGAS-RECHIA et al. (1998) que um octassacarídeo reduzido (XXLGo), obtido da cadeia de xiloglucana presente nas sementes de *Hymenaea courbaril*, é capaz de modular a resposta de β -L-fucosidase em células ou protoplastos de *Rubus fruticosus*, enzima envolvida no processo de expansão celular.

Protoplastos de *Rubus fruticosus*, na presença de uma fração de O-glicana (glicoproteína) isolada do fungo *Fusarium oxysporum* L., aumentaram a produção de ERO (NITA-LAZAR et al., 2004), além de ocorrer um decréscimo da atividade do complexo da FAL (NITA-LAZAR et al., 2002), comprovando que esse fragmento de glicoproteína tem ação elicitora nessas células.

Patier et al. (1995) mostraram que fragmentos provenientes do polissacarídeo de laminarina (β -1,3-glucana), que constitui a parede celular de várias espécies de fungos patogênicos e são encontrados em herbicidas, são capazes de aumentar a atividade da enzima D-glicanases (β -1,3-glucanase e β -amilase) em células de *Rubus fruticosus*. Foi demonstrado também que uma β -carragenana é capaz de aumentar a atividade da enzima β -1,3-glucanase no mesmo sistema de células em suspensão.

1.4.1. Ácido Salicílico (AS)

Muitos estudos têm constatado que a aplicação do ácido salicílico em plantas induz resistência contra vários patógenos, e que os vegetais podem sintetizá-lo, acumulá-lo sob certas condições metabólicas e transportá-lo no floema, tecido condutor da seiva em plantas vasculares.

O AS é sintetizado a partir da **rota do chiquimato** que pode ser direcionado por dois caminhos: a **via dos fenilpropanóides** e a **via do isorismato** (Figura 6). Na resposta de hipersensibilidade, onde ocorre à morte celular, foi sugerido que o ácido salicílico é

biossintetizado pela via dos fenilpropanóides e durante a RSA, a síntese de AS, ocorre pela via do isocorismato (WILDERMUTH et al., 2001; STRAWN et al. 2007).

A formação do ácido chiquímico se dá pela condensação do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, que são compostos derivados da glucose, por meio da glicólise e da via da pentose fosfato, respectivamente (VERBERNE et al., 2000). Esse ácido se liga ao fosfoenolpiruvato originando o ácido corísmico (corismato) para a formação dos aminoácidos aromáticos precursores dos fenilpropanóides, como a fenilalanina ou participa da via do isocorismato para a formação do AS (LEE, LÉON; RASKIN, 1995; SCHINEIDER et al., 1996).

Após a RH, as plantas freqüentemente desenvolvem uma resistência de longa duração, a resistência sistêmica adquirida (RSA) que acumula AS. Com a presença do AS ocorre o acúmulo das proteínas ligadas à patogênese e os genes de expressão são ativados (ROCHA et al., 2000; KUMAR; KLESSING, 2003). Dados sugerem que o AS também é responsável pela morte celular, possivelmente por meio de um “feedback” positivo que envolve as espécies reativas de oxigênio (KUMAR; KLESSING, 2003).

Para investigar o modo como o AS exerce os seus efeitos, vários mecanismos foram estudados. As proteínas catalase, ascorbato peroxidase e anidrase carbônica foram identificadas. Essas três enzimas são moduladas por AS, que em baixa a moderada afinidade e parecem ter atividade antioxidante (KUMAR; KLESSING, 2003). Apesar da importância do AS na defesa vegetal ser aceita, o seu papel central ainda não é completamente esclarecido (GRANT; LAMB, 2006; MYSORE, 2008; SHAH, 2003).

No trabalho de Park et al. (2007) foi identificado o metil salicilato (MeAS) como a forma móvel do AS. O AS é convertido em MeAS pela enzima AS metil transferase no local de sua síntese (PARK et al. 2007). Como o MeAS é volátil pode participar na sinalização entre as plantas vizinhas (SHULAEV et al. 1997), atravessando os diferentes tecidos, sendo hidrolisado a AS nas células alvo pela atividade da proteína 2 ligante de AS (SABP2) (PARK et al. 2007).

A aplicação de AS exógeno ou seus análogos funcionais, tais como o acibenzolar S-metil (benzotiadiazole, BTH), induz RSA nas plantas, resultando em resistência a determinados patógenos (ACHUO et al., 2004; RESENDE et al., 2000). Inversamente, as plantas expressando o gene bacteriano *NahG*, que codifica a enzima salicilato hidroxilase, responsável para a conversão do AS em catecol, estão mais suscetíveis a diversos patógenos (GAFFNEY et al., 1993). Plantas transgênicas que expressam a enzima salicilato hidroxilase

não são capazes de acumular AS e, conseqüentemente, não desenvolvem RH e RSA (DELANEY et al., 1994).

O AS também pode afetar a interação da planta com microrganismos simbióticos, como demonstrado pelo aumento da nodulação da raiz após a inoculação com *Mesorhizobium Loti*, em plantas transgênicas de *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula* expressando *NahG* (ANAND et al., 2007, 2008; STACEY et al., 2006).

Plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas com AS foram menos suscetíveis a infecção por *Agrobacterium* sp., enquanto que plantas de *Nicotiana benthamiana*, com genes envolvidos na biossíntese de AS silenciados, foram hipersusceptíveis à infecção por agrobactérias (MYSORE, 2008).

Foi sugerido que o AS participe do sistema de controle da produção de calor durante a floração das plantas termogênicas. Em *Arum* sp., o AS induz a termogênese, que libera compostos de odor voláteis que ajudam na polinização (RASKIN et al., 1987). A energia para termogênese é fornecida por um aumento do fluxo dos elétrons mitocondriais, pelo transporte alternativo da enzima alternativa oxidase (AOX), que desvia o transporte de elétrons a partir da via do citocromo *c* e desacopla a produção de ATP (MEEUSE, 1975).

Muitos trabalhos demonstraram que o papel do AS na RH possivelmente está relacionado com a inibição das funções mitocondriais (XIE; CHEN, 1999). Estudos com plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) sugerem que a enzima alternativa oxidase (AOX) pode estar envolvida na RH (ORDOG et al., 2002; ROBSON; VANLERBERGHE et al., 2002), já que ela é induzida pelos produtos químicos, como o cianeto e antimicina A, que são capazes de inibir o percurso de elétrons no citocromo, aumentando assim a formação de ERO (MAXWELL et al., 1999; VANLERBERGHE et al., 1994; WAGNER; WAGNER, 1997). O AS também pode ter efeito na inibição respiratória; contudo, a indução do AS no mecanismo de AOX e o seu local de ação em células de tabaco não foram esclarecidos (CHEN; XIE, 1999; MAXWELL et al., 2002).

Os avanços na compreensão dos mecanismos de defesa da planta revelam que esta apresenta uma rede de percursores de transdução de sinais, alguns dos quais são independentes do AS. Estudos evidenciam que o jasmonato e o etileno desempenham papéis importantes no caminho independente do AS (PIETERSE; VAN LOON, 1999; TRUMAN et al. 2007).

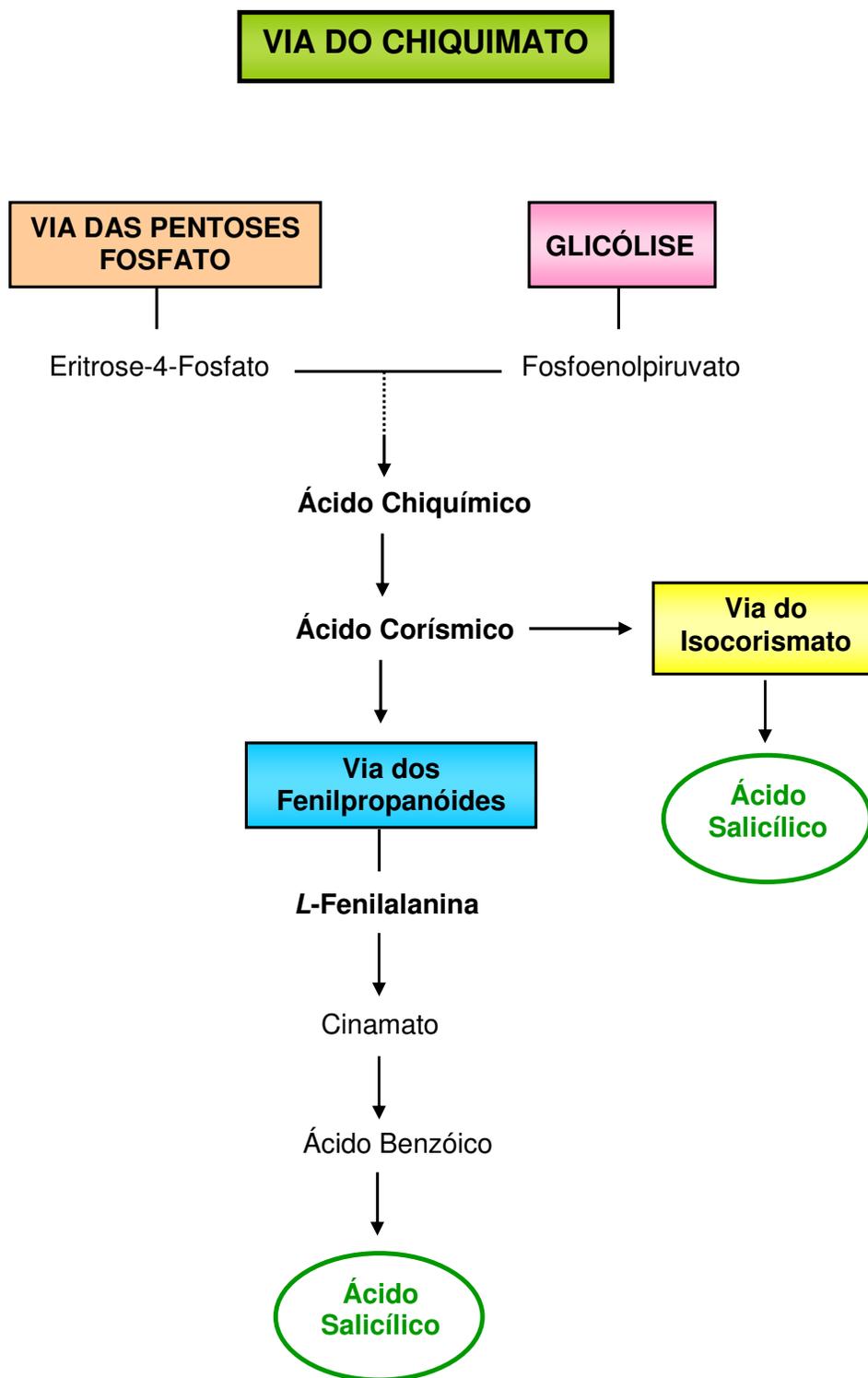


Figura 6. Representação da **Rota do Chiquimato**. O corismato (ácido corísmico) é convertido a isocorismato e transformado em ácido salicílico ou então participa da via metabólica dos fenilpropanóides para posteriormente ser convertido em ácido salicílico.

1.4.2. Ácido Jasmônico (AJ) e Metil Jasmonato (MeJA)

O ácido jasmônico foi isolado pela primeira vez em 1962 do óleo essencial de *Jasminum grandiflorum*, posteriormente foi isolado do óleo de *Rosmarinus officinalis* (CARLETI et al., 1999).

A biossíntese do precursor de MeJA, o AJ, é ativado por estímulos externos, tais como radiação ultravioleta, ferimento mecânico, ataque de herbívoros, sistemas de elicitores e outros. O MeJA influencia a expressão de vários genes, alterando a abundância de seus correspondentes polipeptídeos (DEVOTO; TURNER, 2003).

O MeJA é biossintetizado pela via do ácido linoléico, pela **rota octadecanóide** (Figura 7) e sua estrutura básica é caracterizada por um anel ciclo pentano (SEMBDNER; PARTHIER, 1993). Com a ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) ocorre a liberação intracelular do ácido linolênico (AL). O AL é convertido a ácido 13-hidroperóxido-octadecatrienóico (13-HPOT) pela enzima lipoxigenase (LOX) presente nos cloroplastos. Posteriormente, a enzima aleno óxido sintase (AOS) forma o ácido oxo-fitodienóico (OPDA), essa ciclopentanona sinaliza no citosol ou se converte em oxo-pentenil-ciclopentano (OPC).

Nos peroxissomos, os OPC são reduzidos e β -oxidados formando o precursor AJ, que pode ser metilado no citosol. O MeJA pode atuar nas células com ativação dos genes presentes no núcleo das células, agir em células vizinhas ou ainda ser inativado (FARMER; RYAN, 1992; WEBER, 2002).

O JA e o MeJA são moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos dos vegetais, tanto em flores como em frutos (PARTHIER, 1990; VEDA; KATO, 1980). Participam da resposta de defesa ao estresse abiótico e biótico, da síntese e acúmulo dos metabólitos secundários (DOARES et al., 1995; FACCHINI et al., 1996; SLESACK et al., 2001), acúmulo de proteínas de armazenamento (STASWICK et al., 1991), desenvolvimento de embriões (WILEN et al., 1991), do desenvolvimento da senescência (MASON; MULLET, 1990) e ainda sobre efeitos inibidores nos vegetais, alguns dos quais são semelhantes aos mediados pelo ácido abscísico e etileno (UEDA; KATO, 1980; PARTHIER, 1990).

O MeJA apresenta um importante papel na comunicação inter-plantas para o aumento de resistência contra um determinado herbívoro presente na agricultura. Assim, plantas vizinhas ainda não infectadas adquirem RSA antes da presença do patógeno, aumentando sua resistência (SLESACK et al., 2001).

Muitos estudos comprovam que o tratamento com o MeJA tem a capacidade de aumentar a síntese de enzimas da rota do octadecanóide (SIVASANKAR et al., 2000).

Estudos em folhas de maracujá, tratadas com o MeJA, tiveram forte indução da enzima lipoxigenase (LOX) (RANGEL et al., 2002) e aleno óxido sintase (AOS). Resultados similares do acúmulo de AOS foram observados em plantas de tomate que expressam AOS em resposta a herbívoros (HOWE et al., 2000). Em linho, HARMS et al. (1998) demonstraram a indução de AOS devido a um ferimento mecânico e com o tratamento com MeJA.

A atividade biológica do MeJA é altamente dependente da sua concentração nas plantas. Em concentração baixa (1 até 10 μM) nos tecidos atua na indução da expressão gênica relacionada com a defesa da planta, sendo que em concentrações altas (acima de 50 μM) provoca senescência, induzindo a morte celular (MASON; MULLET, 1990).

Jung (2004) estudou folhas de *Arabidopsis* sp. e comprovou que a adição do hormônio MeJA após sete dias, aumenta aproximadamente 100 vezes a atividade da enzima peroxidase. Alguns estudos utilizando proteína de elicitação isolada de diversos patógenos, por exemplo harpina, sugerem que o MeJA possui a capacidade de inibir a RH (ANDI et al., 2001).

Em milho (*Zea mays* L.) foi comprovada a contribuição dos ácidos ciclo-hidroxicarboxílicos, por exemplo: 2,4-diidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona e o aleloquímico diidroxi metoxi-benzoxazinona (DIMBOA), na resistência de plantas aos insetos (FREY et al., 1997). Os pulgões que se alimentaram com plantas de milho com uma alta concentração de DIMBOA reproduziram-se menos e demoram mais para atingir o estágio adulto de desenvolvimento. Com isso, as colônias de pulgões nessas plantas diminuíram, permitindo que a planta conseguisse suportar melhor o ataque do inseto. O tratamento de planta com o JA (ou MeJA) exógeno pode induzir o aumento dos derivados do alelo químico DIMBOA em folhas de milho (OIKAWA et al. 2001; WANG, 2007), mostrando que possivelmente, alguns mecanismos de defesa induzidos por AJ, como o acúmulo dos compostos secundários, pode funcionar como agentes alelopáticos (WANG, 2007).

A correlação entre os hormônios jasmonato e etileno tem sido mostrada em uma série de sistemas (FARMER et al., 2003). Em respostas aos diferentes agentes patogênicos, em *Arabidopsis* sp., o jasmonato e o etileno apresentaram efeito sinérgico na indução de genes relacionados com a defesa (HUDGINS; FRANCESCHI, 2004; PENNINCKX et al., 1998; XU et al., 1995). Em plantas de tomate, tratadas com fração de proteína da parede celular composta de duas glicoproteínas (POD-1 e POD-2) do agente não patogênico *Pythium oligandrum*, foram ativadas as vias de sinalização dependentes de AJ e etileno e reforçada a resistência a *Ralstonia solanacearum*, agente causador da murcha-bacteriana (KAWAMURA et al., 2009, TAKENAKA et al. 2006, HASE et al. 2008).

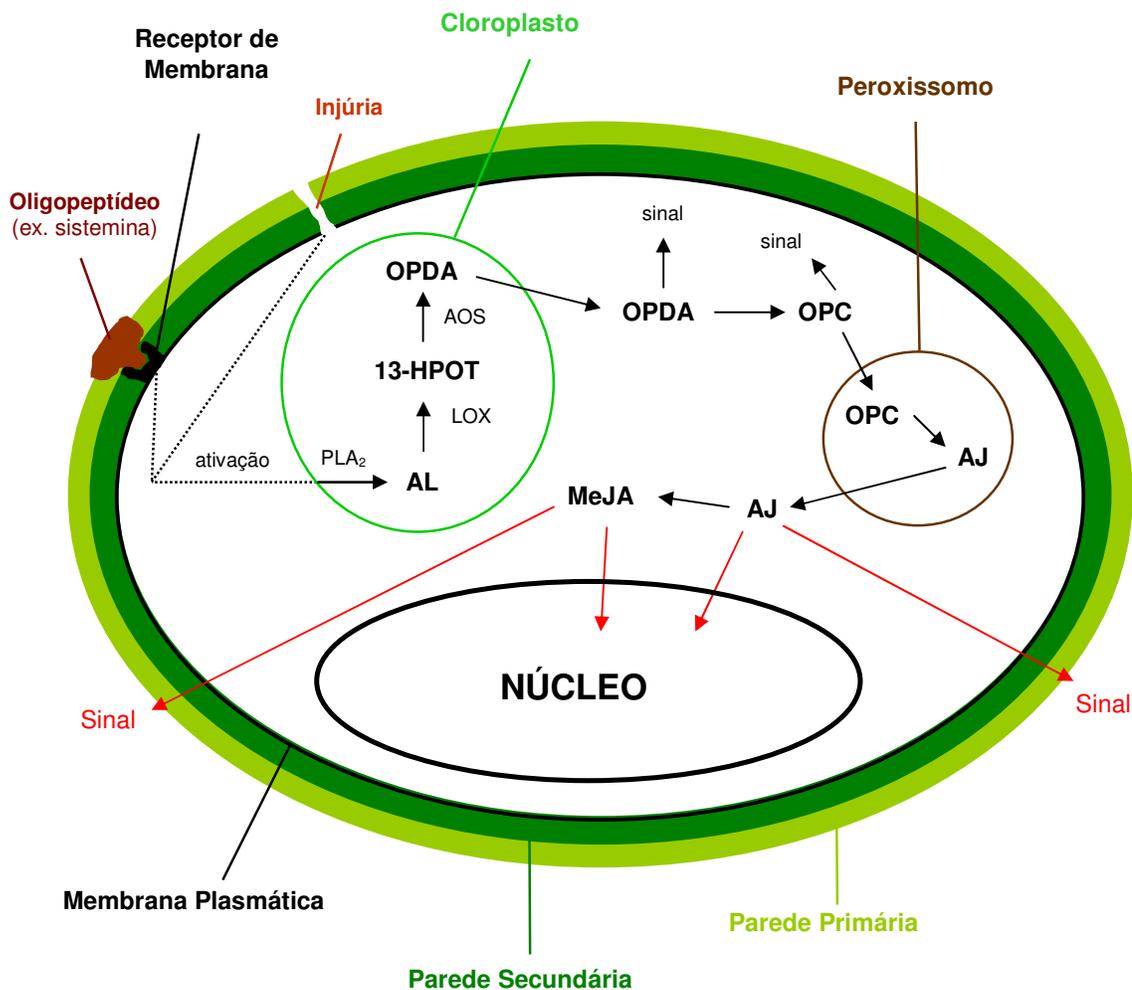


Figura 7. Representação da **Rota do Octa-decanóides** em células vegetais para a biossíntese do metil jasmonato (**MeJA**). O octadecamérico (sistemina) inicia uma cascata de eventos intracelulares resultante da ativação de uma enzima fosfolipase A₂ (**PLA₂**) citoplasmática que libera ácido linolénico (**AL**), que pode ser convertido em ácido jasmônico (**AJ**). O AJ após sair do peroxissomos são metilados formando o metil jasmonato (**MeJA**).

1.4.3- Ramnoglucuronogalactana (F-I)

Chorisia speciosa é uma espécie arbórea nativa das florestas brasileiras, conhecida como paineira, pertence à família da Malvaceae. São distribuídas na América do Sul, principalmente no estado do Paraná (BELESKI-CARNEIRO et al., 1999; BELESKI-CARNEIRO et al., 1996).

A partir da testa de sementes da paineira foi isolado o polissacarídeo denominado de **Ramnoglucuronogalactana (F-I)**. Esse polissacarídeo é formado por unidades de **galactose**, **ácido glucurônico** e **ramnose**, na proporção molar de 44:31:25, respectivamente. A cadeia principal é formada por (1→4)-β-D-galactopiranosil com a extremidade constituída por ramnose e galactose (BELESKI-CARNEIRO et al., 1996; BELESKI-CARNEIRO et al., 1999; BELESKI-CARNEIRO et al., 2002).

Folhas de milho (*Zea mays*) infectadas com o fungo *Colletotrichum graminicola*, responsável pela doença da antracnose em plantas, foram tratadas com o polímero F-I, ocorrendo um decréscimo na adesão do fungo nas folhas (BELESKI-CARNEIRO et al., 2002). Além disso, estudos em nosso laboratório sugerem que o F-I estimula a atividade de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), como a quitinase e a laminarinase e induz o acúmulo de compostos fenólicos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (DE SOUZA, 2005).

1.5. Proteína-RP

Van Loon e Van Kammen (1970) começaram a investigar as macromoléculas (polipeptídeos) que se acumulavam durante a RH devido à infecção pelo vírus do mosaico do tabaco. Desde então, a ocorrência de muitas proteínas-RP têm sido registrada em uma grande variedade de espécies vegetais (CUTT; KLESSIG, 1992).

As proteínas-RP são proteínas antifúngicas que se acumulam em plantas durante a interação do patógeno (WARD et al., 1991). Foram descritas cerca de 13 classes de proteínas antifúngicas, entre elas são encontradas as proteínas-RP, classificadas em cinco grupos, baseados nos aspectos sorológicas, na massa molecular e na composição em aminoácidos. As **RP-1**, que são de forma ácida RP-1a, -1b e 1-c e a forma básica RP-1g, têm sido descritas em arroz, trigo, amido, tabaco entre outros vegetais. As **RP-2**, também conhecidas como β-1,3 glucanases, atuam principalmente em polissacarídeos estruturais, como β-glucana encontrada na parede celular dos fungos. As **RP-3** (quitinases) hidrolisam a quitina presente na parede dos fungos. As **RP-4** (proteínas R1, R2 e S2) são proteínas ligantes de quitina e foram isoladas de folhas de fumo infectadas com TMV. Por último, as **RP-5** (osmotina e n-

osmotina) possuem mecanismo de ação ainda não conhecido. Acredita-se que elas atuem na lise rápida da parede do fungo alterando a permeabilidade celular (STICHER et al., 1997; SELITRENNIKOFF, 2001).

As enzimas quitinolíticas ou quitinases são enzimas capazes de degradar a quitina (HARMAN et al., 1993), que é um componente estrutural da parede celular, principalmente, de fungos. Portanto, sua ação antibacteriana é devido à ação de isoenzimas sobre a parede celular (STINTZI et al., 1993). Elas catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ presentes em biopolímeros de *N*-acetilglucosamina (KASPRZEWSKA, 2003).

As quitinases podem ser divididas em três grupos: (1) as endoquitinases, (2) as exoquitinases que podem ser divididas em dois grupos: (2a) as quitinabiosidases e (2b) as $\beta(1-4)$ *N*-acetil-glicosaminases e (3) as *N*-acetil-glicosaminases (HARMAN et al., 1993).

As quitinases são reguladas por uma grande variedade de condições de estresse, tanto bióticos quanto abióticos, por fitormônios como etileno, ácido jasmônico (proteínas-RP ácidas) e ácido salicílico (proteínas-RP básicas) (KASPRZEWSKA, 2003). No entanto, existe pouco estudo sobre sua ação de defesa contra a colonização dos microrganismos invasores na planta (CAVALCANTI, 2006).

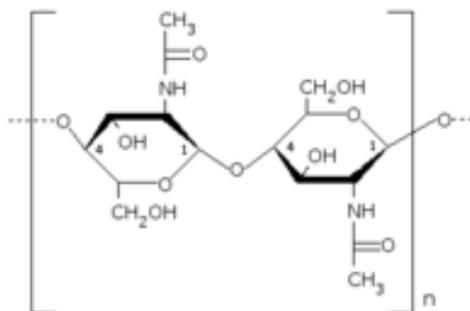


Figura 8. Esquema representativo da ligação da quitina (adaptado do site <http://www.melhordawiki.com.br/wiki/Quitina>).

As $\beta(1-3)$ glucanases (laminarinases) (Figura 9) são enzimas que degradam polímeros de $\beta(1-3)$ glucanas, constituintes da parede celular de fungos. São também chamadas de glucana-endo- $\beta(1-3)$ -D-glucosidases e catalisam a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da $\beta(1-3)$ -glucana. (FLEURI; SATO, 2005).

As β -glucanases são também classificadas como *O*-glicosil hidrolases e podem ser divididas, baseando-se no sítio de hidrólise que elas agem, como: $\beta(1-3)$ ou $\beta(1-6)$

endoglucanase, que clivam o polímero de β -glucana aleatoriamente e $\beta(1-3)$ ou $\beta(1-6)$ exoglucanase que atuam nas pontas não redutoras desse polímero (NORONHA; ULHOA, 2000; GIL-AD et al., 2001).

As glucanidrolases ($\beta(1-3)$ -glucanases, $\beta(1-3)$ -(1-4)-glucanases e $\beta(1-4)$ -glucanases) podem atuar de duas vias diferentes: pela degradação da parede celular do patógeno apresentando um efeito direto ou podem agir indiretamente, promovendo a liberação de material derivados da parede celular que atuam como elicitores da reação de defesa (NORONHA; ULHOA, 2000; GIL-AD et al., 2001).

A injúria no tecido vegetal provoca a deposição de $\beta(1-3)$ -glucana, na parede celular em forma de calose, assim, parte do ferimento é fechado ou limitado e a invasão do patógeno é restringida (MOROHASHI; MATSUSHIMA, 2000).

Owen et al. (1998) observaram um aumento da resposta de defesa devido o aumento significativo na atividade da enzima $\beta(1-3)$ -glucanase em raízes de plantas de videira tratadas com o indutor químico acibenzolar-*S*-metil (ASM), tornando a planta mais resistente contra os nematóides patogênicos *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne arenaria*.

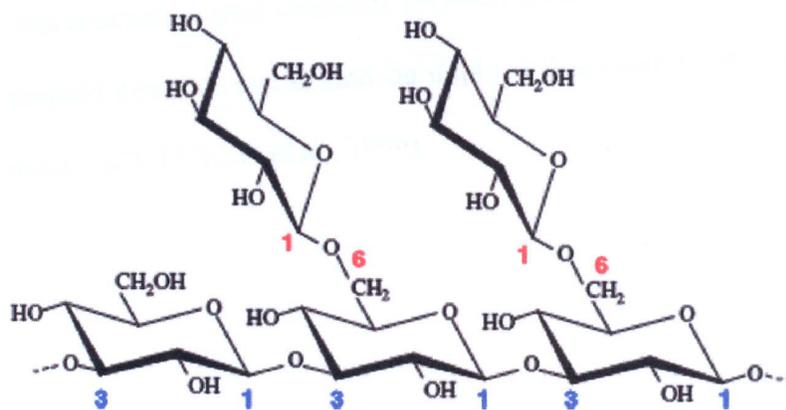


Figura 9. Representação estrutural do polímero de glicose em ligação glicosídica do tipo $\beta(1,3)$ (em azul) e $\beta(1,6)$ (em vermelho) (adaptado: <http://4e.plantphys.net/image/ch15/wt1501c> s.png).

As substâncias pécicas ocorrem principalmente na forma de protopectinas e formam o maior componente da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores

(ALKORTA et al., 1998), podem ser degradadas por enzimas pécnicas produzidas naturalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (GAINVORS et al., 1994). Essas substâncias pécnicas são macromoléculas de alta massa molecular, compostas de unidades de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (KAYSHAP et al. 2001; LIMBERG et al., 2000; VILARIÑO, 1993). Elas são classificadas em protopectina, a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais, insolúvel em água e totalmente metoxilada; ácido pécnico, compostas de unidades de ácido poligalacturônico coloidal completamente desmetoxilada, e pectina e ácido pectínico que possuem um grau variável de metoxilação e, em condições adequadas, são capazes de formar géis com ácidos e açúcares (MAIORANO, 1990; McCREADY, 1970; SAKAI et al., 1993; WHITAKER, 1994).

A enzima poligalacturonase (hidrolase) atua na hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 entre duas unidades de ácido galacturônico do ácido pécnico (BRAVERMAN, 1963) e as liases (pectina liase, PMGL), também chamadas de transeliminases, rompem ligações glicosídicas, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5. Braverman (1963) descreve que a protopectina pode ser hidrolisada por ácido ou ação da protopectinase, liberando os ácidos pectínicos. O grupo metílico dos ácidos pectínicos é eliminado pela ação da enzima pectinametilsterase, liberando metanol e pectinas com poucos grupos metílicos, que por sua vez sofrem hidrólise pela ação da despolimerase, formando os ácidos pécnicos (poligalacturônico). A enzima poligalacturonase atua sobre os ácidos poligalacturônicos, liberando os ácidos D-galacturônicos e elementos minerais não-essenciais (PIMENTA; CHAGAS; COSTA, 2000).

1.5.1. Enzimas de Degradação de Parede Celular e Mecanismos de Defesa em Plantas

Diversos microrganismos patogênicos possuem mecanismos responsáveis pela síntese e liberação de enzimas (celulase, pectinase, xilanase, protease) capazes de hidrolisar os polímeros que formam a parede celular das plantas. Os fragmentos liberados da parede celular, devido à ação enzimática (oligossacarídeos), atuam como moléculas sinalizadoras desencadeando o mecanismo de defesa da planta (D'OVÍDIO et al., 2004). Para a ampliação dos mecanismos de defesa, a própria planta produz essas enzimas depolimerizantes presentes em sua parede celular (ROSE; BENETT, 1999).

As *exo-O*-glicosil-hidrolases, como as β -D-galactosidase, β -D-glucosidase e α -D-xilosidase liberam da parede celular monossacarídeos ou dissacarídeos, clivando

sucessivamente os poli ou oligossacarídeos da extremidade não redutora. Essas enzimas não atuam nas ligações glicosídicas de unidades de glucose substituídas por certos grupamentos, como *O*-acetil, *O*-feruloil-ésteres, que podem estar ligados na cadeia de polissacarídeos da parede celular. Entretanto, as endo-*O*-glicosil-hidrolases conhecidas como endoglicanases (endoglucanases, endoxiloglucanases) hidrolisam as ligações glicosídicas da região interna da cadeia dos polissacarídeos (FRY, 1995).

As enzimas endoglucanases e a xiloglucana endotransglicosilase (XET), que estão presentes na parede celular de muitas plantas, atuam na interação das microfibrilas de celulose com as xiloglucanas, hidrolisando as ligações cruzadas das xiloglucanas e modificando a posição dos fragmentos de cadeia de xiloglucana na parede celular, respectivamente (POTTER; FRY, 1993, 1994; NISHITANI; TOMONAGA, 1992).

Outras enzimas encontradas nas plantas participam do crescimento das células dos vegetais, onde a parede celular das plantas sofre sucessivas reações enzimáticas que hidrolisam as glucanas e outras ligações dos polissacarídeos. Um estudo com *Pisum sativum* demonstrou a participação da enzima α -galactosidase durante o crescimento da planta, além de protegê-la contra os microorganismos invasores (DOPICO; NICOLÁS; LABRADOR, 1989).

Enzimas como a xiloglucana transglicosilase hidrolase (XTH) atuam na degradação e no rearranjo das xiloglucanas da parede celular primária, provavelmente alterando os sítios da rede de microfibrilas de celulose, permitindo o alongamento e a expansão durante o crescimento celular (NISHITANI, 1997; ROSE et al., 2002).

De acordo com Lynd et al. (2002), existem no mínimo três classes de enzimas que atuam na degradação da celulose: as endoglucanases que hidrolisam internamente ligações glicosídicas, gerando celo-oligossacarídeos; as exoglucanases ou celobiohidrolases, que hidrolisam as extremidades não redutora da cadeia de celulose e celo-oligossacarídeos, liberando o dissacarídeo celobiose; e as β -glucosidases que agem na hidrólise de celobiose e celooligossacarídeos curtos, gerando a glucose. Essas enzimas atuam nas ligações glicosídicas presentes, principalmente, na rede de celulose da parede celular das plantas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A enzima β -glucosidase é a única que consegue catalisar a quebra da ligação entre os dissacarídeos, liberando a molécula de glucose para ser usada em diversas rotas metabólicas das plantas (ERIKSSON et al., 1974; IGARASHI et al., 2003; LYND et al., 2002).

Muitos trabalhos reportam a capacidade das enzimas endoglucanases e das β -glucosidases em degradar xiloglucanas, além de celulose. As β -glucosidases apresentam

muitas isoformas e possuem diversas especificidades, podendo muitas vezes apresentar variações por meio de separação eletroforética (SINGH et al., 1996; SHARMA et al., 1991).

Em cultura do fungo de *Aspergillus* sp., foram identificadas três isoformas de β -glucosidases, sendo duas intracelulares e uma extracelular. Elas se distinguem por modificação pós-traducionais (glicosilação) (IWASHITA et al., 1998).

As exo- β -D-galactosidases atuam na remoção de unidades β -D-galactosil de terminais não redutoras modificando a parede celular (GIEHL, 2005; GROSS; SAMS, 1984). Em tomate foram verificadas três isoformas de β -galactosidases, denominadas de I, II e III. As isoformas I e III apresentam alta atividade nos frutos imaduros e a atividade da isoforma II foram aumentadas durante o amadurecimento (CAREY et al., 1995; GIEHL, 2005). Em sementes quiescentes de *Ricinus communis* observou-se que atividade de β -galactosidase pode aumentar durante a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (HARLEY; BEEVERS, 1985).

A β -galactosidase age em conjunto com as enzimas pectolíticas. Com isso, elas são capazes de afrouxar a estrutura da parede celular (KONNO, 1986). Sua ação consiste na quebra de ligações cruzadas do tipo $\beta(1-4)$ entre os polímeros pécnicos e de hemiceluloses. Isso foi comprovado pela perda de galactose da parede celular antes do acúmulo de poliuronídeos solúveis. Além disso, esses poliuronídeos não possuíam unidades galactosil em sua estrutura, diferentemente de quando se encontravam na parede (BARTLEY, 1974).

Durante o amadurecimento de uvas, Barnavon et al. (2000) observaram alterações na composição de monossacarídeos da parede celular e constataram que era somente o acúmulo de glucose e o decréscimo de galactose. Com isso, estudos demonstraram que a enzima β -galactosidase que degrada a parede celular aumentava sua atividade após o “veraison”, que é um estágio de desenvolvimento da uva que ocorre o acúmulo rápido de açúcares e de antocianinas e o amolecimento da baga durante o estágio de desenvolvimento da uva (NUNAN et al., 2001).

Muitas enzimas que modificam os oligossacarídeos de xiloglucana têm sido detectadas em parede celular de plantas (FRY, 1995). A enzima α -L-fucosidase é capaz de liberar o monossacarídeo de fucose da cadeia lateral dos oligossacarídeos de xiloglucana e tem sido purificado de plantas como ervilhas (*Pisum sativum*), epicótilos (FARKAS et al., 1991; AUGUR et al., 1993), de *Brassica oleracea* (De La TORRE et al., 2002), de fungos (BAHL, 1970) e bactérias (WONG-MADDEN; LANDRY, 1995). Além disso, o cDNA que codifica

α -L-fucosidase tem sido estudado e isolado de fígados de humano (FUKUSHIMA et al., 1985; OCCHIODORO et al., 1989) e rato (FISHER, ARONSON, 1989).

A α -L-fucosidase purificada da ervilha foi descrita como proteína de parede celular de 20 KDa que hidrolisa substrato de oligossacarídeos contendo fucosil- α -1,2-Gal (AUGUR et al., 1993)

Os oligossacarídeos derivados da xiloglucana estão envolvidos na regulação da indução da auxina (McDOUGALL, FRY, 1998, 1990) e o *t*-fucosil é necessário para a regulação do efeito de XXFG (FRY et al., 1993). Em plantas de *Arabidopsis* com o gene mutante *mur*, apresentam deficiência de Fuc (REITER et al., 1993), mostraram inibição no crescimento e paredes celulares frágeis (De La TORRE et al., 2002).

O gene GH95 que codifica α 1,2-fucosidase foi identificado em *Arabidopsis thaliana*. A enzima recombinante correspondente AtFuc95A mostrou ativa em xiloglucana e em fragmentos de xiloglucana convertendo XXFG para XXLG quando expressa em *Nicotiana benthamiana*, mas não clivou oligossacarídeos contendo α 1,3, α 1,4 or α 1,6-fucose e *p*-nitrofenil-fucose. Esses resultados propõem que o gene *AtFuc95A* apresenta papel importante no metabolismo de xiloglucanas (LÉONARD et al., 2008).

As xilanases (endo- β (1-4)-xilanases e β -xilosidases) são outro grupo de enzimas envolvidas no processo de ataque dos fitopatógenos. Além do substrato xilana, essa enzima apresenta como substrato a xilose que também pode ser encontrado nas cadeias de hemiceluloses (CAVALCANTI, 2006).

As β -xilosidases, do fungo *Aspergillus* sp., são muito específicas para os xilooligossacarídeos curtos não substituídos e apresentam mecanismos hidrolíticos denominados de retentores (DE VRIES et al., 2001).

A galacturonase pertence a um grupo de enzimas conhecidas como pectinases e é caracterizada em função do substrato: pectina, ácido pécico ou oligos de D-galacturonatos e pelo modo de atuar nos substratos. Essas enzimas clivam ligações glicosídicas no interior das moléculas (denominada de endopoligalacturonases) ou nas ligações externas (denominada de exopoligalacturonases) (GAVA, 1998).

A presença de grupos metoxílicos na molécula de pectina pode inibir a ação da poligalacturonases, pois essas enzimas atuam na presença de grupos carboxílicos livres no substrato (DINU, 2001).

Bai et al. (2004) citam em seu trabalho que as endopoligalacturonase (EndoPG), por degradarem a parede celular dos vegetais liberando oligopectinas, estão envolvidas nos

mecanismos de defesa das plantas. Esses fragmentos têm a capacidade de agir como moléculas sinalizadoras durante a RSA.

A clivagem da endoPG é menos efetiva quando comparamos com exoPG. As endoPG normalmente liberam oligogalacturonatos e, em menor quantidade, mono e digalacturonatos; a exoPG produzem, principalmente, os monos e digalacturonatos (SOUZA-LIMA, 2006).

1.6. Amora-Preta (*Rubus fruticosus*) e Cultura de Células

O gênero *Rubus*, pertencente à família Rosaceae, forma um grupo diverso e bastante difundido. Dentre as espécies de maior interesse agrônomico deste gênero, destacam-se *Rubus idaeus* (framboesa) e *Rubus fruticosus* (amora preta), para os quais se estima existir entre 400 a 500 espécies de framboesas e amoreiras-pretas distribuídas na América, Europa, África e Ásia (ANTUNES, 2002; ARSEGO et al., 2002).

No Brasil, o cultivo de *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus* iniciou-se em 1972 no Estado do Rio Grande do Sul, com plantas oriundas dos Estados Unidos (ARSEGO et al., 2002). Tem apresentado sensível crescimento de área cultivada, nos últimos anos, no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro) e tem elevado potencial para os demais estados de características climáticas semelhantes (ANTUNES, 2002).

A partir dos anos 80, iniciou-se a possibilidade de micropropagação de muitas culturas, incluindo de framboesa e amora-preta (DONNELLY; DAUBENY, 1986; FINNE, 1986; JENNINGS; McNICOL, 1991; LEONTIEV-ORLOV, 1989), as quais demonstraram grande coeficiente de propagação *in vitro*. As diferentes espécies requerem uma adequação nas condições de cultivo, pois é elevada a variabilidade entre as espécies *in vitro*.

O recente trabalho realizado por De Souza (2007), que utilizou cultura de células de *Rubus fruticosus* tratada com F-I e AS, para avaliar o efeito da RH sobre a parede celular, demonstrou que essas moléculas elicitoras são capazes de ativar a produção de ERO com simultânea liberação de oligossacarídeos de baixa massa molecular da parede celular, enquanto o MeJA atua na liberação de fragmentos com massa molecular maior. Sugerindo que esses fragmentos de maior massa, liberados por MeJA, possam atuar na sinalização responsável pelo espessamento da parede, pela liberação de enzimas e de outras moléculas que englobam o mecanismo de defesa da planta.

Nosso trabalho dá continuidade aos estudos iniciados por De Souza (2007) buscando entender melhor os efeitos da RH sobre a parede celular.

2- OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização estrutural e/ou funcional dos componentes extracelulares liberados durante a resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico (AS), metil jasmonato (MeJA) e ramnoglucuronogalactana do tegumento das sementes de *Chorisia speciosa* (F-I) em cultura de células de *Rubus fruticosus*.

2.2 – Objetivos Específicos

1- Padronizar as condições experimentais para o estudo da variação dos componentes da parede celular, de células de *Rubus fruticosus*, quando da elicitação com AS, MeJA e F-I;

2- Analisar a composição monossacarídica da parede celular elicidadas com AS, MeJA e F-I;

3- Determinar o teor de componentes fenólicos em células de *Rubus fruticosus* elicidadas por F-I, AS e MeJA;

4- Caracterizar a estrutura dos açúcares no meio extracelular (fração E);

5- Determinar as atividades: α -L-fucosidase, β -D-xilosidase, β -D-galactosidase, β -D-glucosidase, laminarinase (β (1,3) glucanases), quitinase e galacturonase no meio extracelular (fração E);

6- Determinar o efeito da elicitação com F-I, MeJA e AS sobre o produção de ERO;

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Equipamentos

- Agitador magnético (MARCONI® MA089)
- Autoclave 4B Luperco (PHOENIX®)
- Balança analítica (SHIMADZU LIBROR®AEL-40 SM)
- Capela de fluxo laminar (ENGELAB®)
- Câmara de Neubauer (Bioblock)
- Centrífuga Beckman J2 – 21
- Espectrofluorímetro modelo F-4500 (Hitachi)
- Espectrofotômetro (DU®-70 BECKMAN)
- Espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS)
- Leitor de microplacas modelo EIA (SIGMA®DIAGNOSTICS)
- Microscópio de luz (Olympus CH2)
- Mixer (PHOENIX® AP14)
- Rotaevaporador (PRIMAR®)
- Sonicador Vibra Cell (SONIC & MATERIALS INC. ®)
- Cromatógrafo Líquido-Gasoso – (Cromatógrafo CG)
- Cromatógrafo, modelo 510, equipado com detector de índice de refração e ultravioleta WATERS

3.2- Reagentes

- Todos os reagentes foram da marca SIGMA-ALDRICH, exceto os reagentes Bio-Rad Protein Assay da marca BIORAD e Folin-Ciocalteu da marca IMBRALAB.

- As culturas de *Rubus fruticosus* foram preparadas a partir de calos cedidos pelo Dr. Paul Joseleau do Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble, França.

- O polissacarídeo ramnoglucuronogalactana (F-I) foi cedido ao nosso laboratório pelo Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR, sob a responsabilidade da Dra. Fany Reicher. O polímero foi obtido pela extração aquosa do tegumento das sementes de *Chorisia speciosa*, purificado e sua estrutura determinada por Beleski-Carneiro et al., 2002.

3.3- Subcultura de células de *Rubus fruticosus*

As células de *Rubus fruticosus* foram cultivadas *in vitro* em meio semi-sólido e líquido e mantidas em sala de cultivo. O meio de cultivo usado para o seu crescimento foi o meio Heller (1953), padronizado de acordo com Hustache, Mollard e Barnoud (1975). As células foram mantidas em sala de cultivo, a 25°C, sob iluminação de 2000lx, com fotoperíodo de 12 horas. Quando em meio líquido foram mantidos sob agitação de 75 rpm.

O meio Heller consiste de macroelementos, microelementos, ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L), vitamina B12 (cloridrato de tiamina 1 mg/L) e glucose (50 g/L). Os sais dos macroelementos (cálcio, potássio, magnésio, sódio e fósforo) são os nutrientes adicionados em grande quantidade no meio e os sais dos microelementos (alumínio, cobre, boro, manganês, níquel e zinco) são colocados em pequenas quantidades (Tabela 1). A glucose é a fonte de carbono para as células vegetais. A cultura em meio semi-sólido foi realizada acrescentando-se ao meio ágar 12 g/L como geleificante. A inoculação das células foi realizada em capela de fluxo laminar, esterilizada com álcool e UV. O repique foi repetido a cada seis semanas.

Tabela 1. Quantidades de macro e microelementos utilizados para preparação do meio de cultura de *Rubus fruticosus*.

Macroelementos		Microelementos	
Substância	mg/L	Substância	µg/L
Cloreto de cálcio	56,5	Cloreto de alumínio. hexa hidratado	54
Cloreto de potássio	750,0	Sulfato de cobre. penta hidratado	30
Sulfato de magnésio	121,0	Ácido bórico	1000
Nitrato de sódio	600,0	Iodeto de potássio	1
Fosfato monossódico	108,7	Sulfato de manganês. mono hidratado	75
		Cloreto de níquel. hexa hidratado	3
		Sulfato de zinco. hepta hidratado	1000

3.4- Preparação das Células Cultivadas

As células de *Rubus fruticosus*, para os experimentos de elicitação, foram retiradas na fase exponencial de crescimento (18-21 dias de subcultura), filtradas em membrana de 100 µm e lavadas com meio Heller. A seguir foram ressuspensas em tampão citrato de sódio 50 mmol/L (pH 5,9) contendo 2 g% de sacarose, 4 mmol/L de ácido etilenoglicol-bis-β-

aminoacetil éter-*N-N-N'-N'*-tetra-acético (EGTA), 3 mmol/L de MgCl₂ e 0,06 mmol/L de CaCl₂ (Tampão de Elicitação TE).

3.4.1- Viabilidade e Contagem Celular

A viabilidade foi determinada por meio do corante azul de Evans (KANAI; EDWARDS, 1973) utilizando 20 µL de azul de Evans a 1% (m/v) adicionados a 200 µL de suspensão de células. Para os experimentos foi considerada uma viabilidade mínima de 90%.

Após a determinação da viabilidade, as células foram contadas para a padronização da quantidade a ser utilizada nos ensaios de elicitação em massa (g) e não em número de células (cél/mL) como se fazia anteriormente em nosso laboratório. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer com utilização de microscópio de luz (aumento de 10X).

3.4.2- Análise da produção de ERO

A produção de ERO foi determinada segundo a metodologia descrita por Lee e colaboradores (1999) e Murata e colaboradores (2001). As células de *Rubus fruticosus* (28,8 mg) foram adicionadas em 25 mL de tampão TE, permanecendo em repouso durante 2 h. Posteriormente, adicionou 2 µL H₂DCF-DA 2 mmol/L e incubou-se durante 20 minutos na ausência da luz. Sem elicitação prévia, as células foram submetidas à cinética da produção de ERO na presença das moléculas indutoras de F-I, AS ou MeJA na concentração de 1 µmol/L durante 1800 segundos (30 minutos). Água deionizada e DMSO foram utilizados como controles da elicitação. O aparelho utilizado para medir a fluorescência foi o Espectrofluorímetro modelo F-4500 (Hitachi) com o comprimento de onda de excitação de 503 nm e de emissão de 529 nm, fendas de 5 e 10 nm, respectivamente, sob voltagem de 700v.

3.4.3- Ensaios de Elicitação

Para os ensaios de elicitação, as suspensões celulares foram preparadas em frascos pretos, para evitar o efeito da luz como elicitor, contendo 1,8 g de células em 24 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L (pH 5,9), contendo 2 g% de sacarose, para cada elicitor analisado. Os sistemas foram mantidos em repouso por 2 horas com a finalidade de minimizar o estresse metabólico causado pela manipulação durante a preparação. Após esse período foi acrescentado 1 mL da solução dos elicitores ácido salicílico (AS), metil jasmonato (MeJA) e ramnoglucuronogalactana de *Chorisia speciosa* (F-I), separadamente, todos na concentração final de 1 µmol/L, permanecendo os sistemas reacionais sob agitação, a temperatura

ambiente, durante 60 minutos. O controle do ensaio foi realizado utilizando-se água deionizada ou dimetilsulfóxido (DMSO) como elicitor. Cada elicitação foi realizada em triplicata e as induções foram interrompidas colocando-se as amostras em gelo. As células foram recuperadas por decantação e 25 mL dos sobrenadantes foram retirados para a análise dos compostos extracelulares (frações E). Às células foram adicionados 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,2, para posterior sonicação (Figura 10).

3.4.4- Análise dos Componentes da Parede Celular

Para análise da parede celular, cada amostra foi sonicada 4 vezes (60 W; 25 s). A seguir foram centrifugadas a 4°C, 12.000 x g, por 15 min e os sobrenadantes (frações I) foram congelados. Os resíduos (Frações P) foram secos em estufa (37°C, 4 horas) e submetidos à hidrólise, redução e acetilação, para posterior análise da composição em monossacarídeos, utilizando a cromatografia líquido-gasosa (GLC).

3.4.4.1- Determinação da Composição Monossacarídica da Fração P

3.4.4.1.1- Hidrólise Total dos Componentes da Parede Celular

Foi realizada a hidrólise de Saeman (1954), em tubos devidamente selados, adicionando 100 mg (peso seco) da fração P, de cada amostra elicitada. A adição do ácido sulfúrico foi realizada em duas etapas, primeiramente utilizou-se 0,5 mL ácido sulfúrico 72% (v/v), em banho de gelo por 1 hora, para a liberação dos oligossacarídeos da parede celular. Após, o ácido foi diluído para 5% (6,7 mL de água destilada), permanecendo durante 18 horas em temperatura ambiente, convertendo os oligossacarídeos em monossacarídeos.

O ácido sulfúrico foi removido por precipitação com carbonato de bário, formando sulfato de bário que foi descartado por filtração. Os hidrolisados foram submetidos a redução e acetilação, como descrito a seguir, para análise em GLC (SAEMAN et al., 1954).

3.4.4.1.2- Redução do Produto de Hidrólise

Os produtos de hidrólise (monossacarídeos livres) foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH₄), pH 9, com agitação periódica durante 1 hora. Os hidrolisados foram mantidos por 48 horas em temperatura ambiente para a redução completa das amostras, assim liberando os alditóis. A seguir, as amostras foram neutralizadas com o ácido acético glacial, concentradas em rotaevaporador a 50°C, até secura. O ácido bórico formado foi eliminado na

forma de seu éster volátil, o borato de trimetila, por sucessivas co-destilações com metanol (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

3.4.4.1.3- Acetilação do Produto de Hidrólise e Redução

Os alditóis formados foram, então, submetidos à acetilação com anidrido acético e piridina (1:1 v/v), durante 18 horas à temperatura ambiente. O processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo e os alditóis acetilados foram extraídos com 1mL de clorofórmio, durante 2 horas. A fase clorofórmica foi lavada várias vezes, seqüencialmente, com sulfato de cobre a 5% e água destilada para a remoção da piridina. Os acetatos de alditóis formados foram transferidos para tubos de hemólise e secos a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

A análise e quantificação da composição monossacarídica da parede celular foi realizada em cromatografia líquido-gasosa (GLC). As amostras foram dissolvidas em algumas gotas de clorofórmio e foram injetadas 1 μ L em cromatógrafo CG, equipado com coluna empacotada com OV-225, mantida à temperatura constante de 190°C, com vaporizador a 230°C e detector de ionização de chama a 250°C.

3.5- Análise do Teor de Proteína na Fração Extracelular (Fração E) e Intracelular (Fração I)

O teor de proteínas da fração E foi determinado segundo o método de Bradford (1976) por microensaio em placa, utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão nas concentrações que variaram de 2,5 a 25 μ g/mL para a confecção de uma curva analítica. Alíquotas de 160 μ L de cada amostra, branco ou padrão reagiram com 40 μ L de reagente BIORAD, composto pelo corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida. O meio reacional de 200 μ L foi homogeneizado e após 5 min, a absorvância foi lida a 600 nm, no leitor de microplaca modelo ELISA (SIGMA®DIAGNOSTICS).

3.6- Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Extracelulares (Fração E) e Intracelulares (Fração I) Totais

As determinações dos compostos fenólicos totais nas frações E e I foram realizadas de acordo com o método Slinkard e Singleton (1977), com leituras efetuadas a 725 nm. Foram utilizados os padrões de ácido gálico para a confecção da curva analítica, nas concentrações de 100 a 1000 μ g/mL. Adicionou 50 μ L de amostra, branco (água deionizada) ou padrão de

ácido gálico com 50 μL de ácido acético a 7% e 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. Homogeneizou-se em agitador vortex e após 3 minutos foram adicionados 50 μL de carbonato dissódico saturado a 35% e 800 μL de água destilada. O meio reacional foi deixado no escuro durante 90 minutos e depois foi realizada a leitura. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

3.7- Determinação do Teor de Açúcares Redutores Extracelulares (Fração E)

A curva analítica foi feita com soluções de glucose (25 até 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em triplicata, adicionou 100 μL de cada fração E, padrão ou o branco (água deionizada) com 3 mL de Ferricianeto de potássio em meio básico (KIDBY; DAVIDSON, 1973), sob aquecimento a 100°C durante 7 minutos. Em seguida, resfriou-se em gelo e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 420 nm.

3.8- Análise das Atividades Enzimáticas Extracelulares (Fração E)

3.8.1- Extração e Quantificação das Proteínas

Para análise das atividades enzimáticas foram utilizadas as frações E tratadas ou não com elicitores (F-I, AS e MeJA) em Meio de Suspensão Celular (Tampão Citrato de sódio 50 mmol/L suplementado com sacarose 2 g%). As frações E foram concentradas por diálise em unidade de ultrafiltração (Ultrafree TM Millipore de 10 kDa), resultando em 200 μL de cada uma das soluções.

A quantificação das proteínas nas frações E concentradas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) como descrito no ítem 3.5.

3.8.2- Ensaios das Enzimas β -D-galactosidase, β -D-glucosidase, α -L-fucosidase e β -D-xilosidase

A atividade das enzimas β -D-galactosidase (EC 3.2.1.22, substrato *p*-nitrofenil- β -D-galactosídeo), β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21, substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucosídeo), α -L-fucosidase (EC 3.2.1.51, substrato *p*-nitrofenil- β -L-fucosídeo) e β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37, substrato *p*-nitrofenil- β -D-xilosídeo) foi determinada por microensaio em placa de Elisa K. Foi adicionado 20 μL de substrato (2 mg/mL) e 80 μL de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,0 contendo 1 μg de enzima (exceto no branco) em cada tempo da cinética. A placa foi incubada a 40°C em estufa.

A reação foi interrompida com a adição de 100 μL de carbonato de sódio 0,1 mol/L. A leitura da absorvância dos íons *p*-nitrofenolato formados foi medida em espectrofotômetro a 405 nm, de acordo com Lee e Zeikus (1993). Cada ponto da cinética foi dosado em triplicata, nos tempos de incubação de 0, 15, 30, 45 e 60 min.

3.8.3- Análise das Atividades Laminarinase, Quitinase e Galacturonase

As atividades enzimáticas de laminarinase (EC 3.2.1.39 ou 3.2.1.6, substrato laminarina), quitinase (EC 3.2.1.14, substrato quitina) e galacturonase (EC 3.2.1.15; substrato ácido poligalacturônico) foram analisadas pelo método da dosagem de açúcar redutor (KIDBY; DAVIDSON, 1973). Foram incubados 25 μL de substrato (2 mg/mL) com 75 μL de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L contendo 2 μg de enzima, a 37°C, em diferentes tempos de cinética. Posteriormente interrompeu-se a reação com a adição de ferricianeto de potássio em meio básico (300 μL). A mistura foi fervida para a determinação do teor de açúcar redutor, com a leitura a 420 nm (item 3.7). Para cada efetor analisado foram realizados três experimentos de indução independentes, sendo cada ponto da cinética dosado em triplicata.

Utilizando o programa GraphPad Prism, foram calculadas as velocidades das reações enzimáticas a partir da equação das retas obtidas e a ativação foi expressa em porcentagem, relacionando a velocidade da amostra com a velocidade do controle

3.9- Análise Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das Frações Extracelulares (Fração E)

As Frações E foram filtradas em unidade de ultrafiltração (Ultrafree TM Millipore de 10 kDa) e analisadas por CLAE. Cada fração (50 μL) foi aplicada em coluna de fase reversa C-18 (Bondpack, 25 x 0,46 cm), fase móvel composta por metanol:água, 3% de metanol, fluxo 0,8 mL/min. A detecção das amostras foi feita por detector de índice de refração.

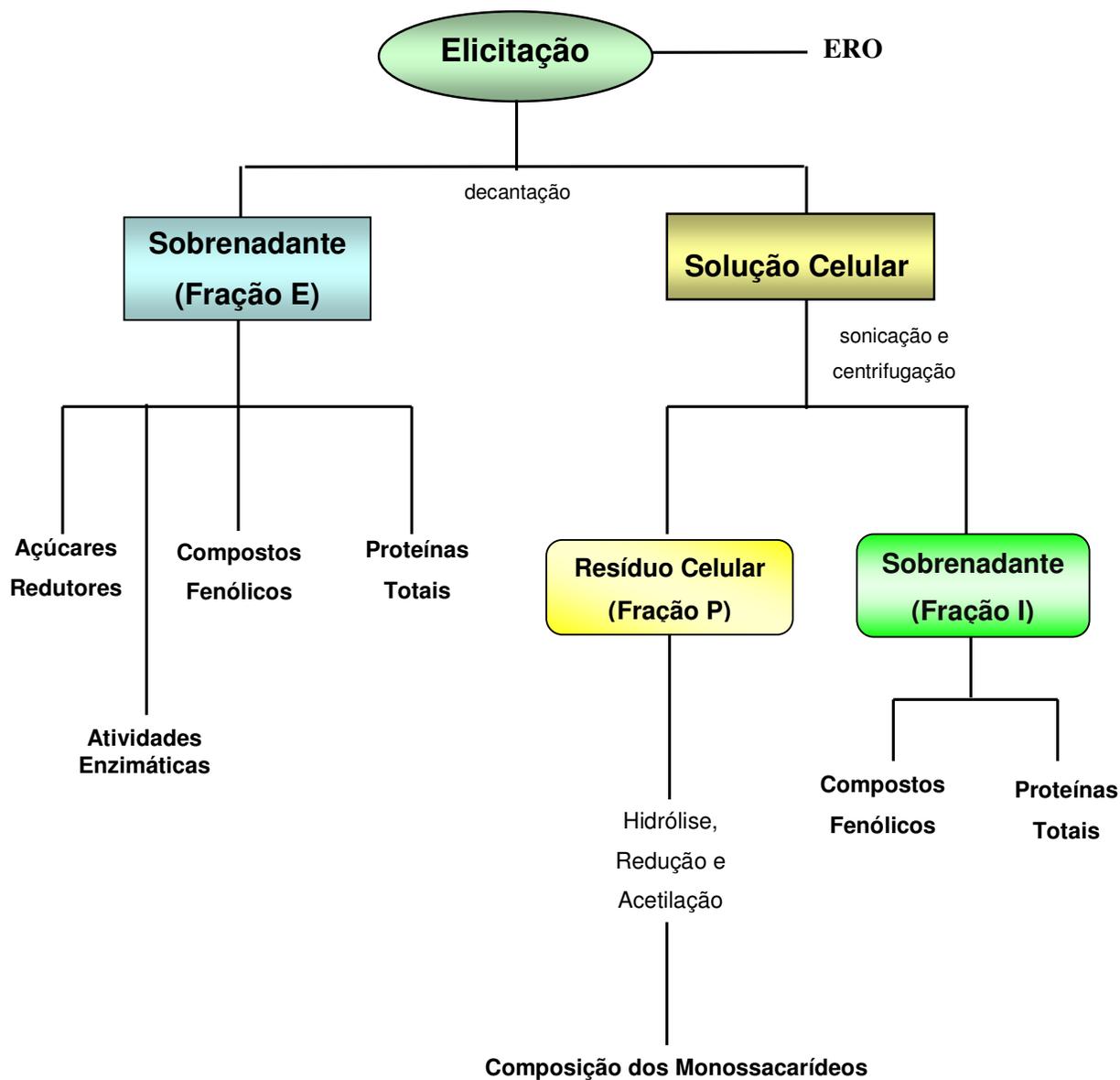


Figura 10. Representação do protocolo experimental dos bioensaios de elicitação com células de *Rubus fruticosus*, seguido por análises das respostas de defesa induzidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Padronização das Condições Experimentais para o Estudo da Variação dos Componentes da Parede Celular.

Os ensaios de elicitação com células de *Rubus fruticosus* eram realizados em nosso laboratório utilizando-se o número de células (2×10^4 células/mL) por ensaio como parâmetro de medida. A contagem dessas células é um fator significativo de dispersão nos valores encontrados nos experimentos devido à dificuldade de contagem das mesmas, pois estas formam grandes agregados. A fim de minimizar esse problema realizou-se a padronização da conversão de número de células para massa de células a ser utilizada nos ensaios de elicitação.

Tabela 2. Número de células de *Rubus fruticosus* em 1 g de massa úmida e massa seca.

	1 g de massa úmida	1 g de massa seca
Número de Células	$556 \times 10^4 \pm 58,5$	$2573 \times 10^4 \pm 306,6$

Foram realizados 11 experimentos isolados, em triplicata, de contagem e pesagem das células, onde as médias obtidas de massa úmida e massa seca estão demonstradas na Tabela 2. Com base nesse resultado, podemos observar que 2×10^4 células/mL correspondem 360 mg de massa úmida. Para a obtenção de uma maior massa de parede celular (Fração P), foi utilizado nos experimentos de elicitação 1,8 g de massa úmida que corresponde 10^7 de células de *Rubus fruticosus* para cada amostra de células elicitadas ou não.

4.2- Efeito de F-I, AS e MeJA em células de *Rubus fruticosus*

Nossos estudos visaram avaliar o efeito sobre RH de um polissacarídeo ácido, a ramnoglucuronogalactana (F-I) extraída de sementes de *Chorisia speciosa*, o qual apresenta uma estrutura com características semelhantes aos galacturonídeos, obtidos de parede celular vegetal e com capacidade de desenvolver respostas de defesa, concomitantemente, com ácido salicílico (AS) e o metil jasmonato (MeJA), mediadores de vias metabólicas distintas de RH, sobre a parede celular em cultura de células em suspensão de *Rubus fruticosus*.

Essa análise foi realizada, correlacionando a produção de ERO na presença desses elicitores, com os efeitos sobre os componentes encontrados no meio extracelular (Fração E). Avaliando a liberação de proteínas totais, compostos fenólicos totais, açúcares redutores e as

atividades enzimáticas no meio extracelular (Fração E), e análise da composição da parede celular (Fração P).

4.2.1- Análise da Produção de ERO

Como já foi descrito na introdução, a produção de ERO pelas células é comum durante o metabolismo celular, sendo geradas na fase aeróbica da fotossíntese e da fotorespiração. Entretanto, quando a planta sofre alguma agressão do meio ambiente, podendo ser de fatores abióticos (como UV, seca, O₃) ou bióticos (como fungos, vírus e insetos), ocorre desequilíbrio na produção de ERO que passam a ser produzidos pela célula em grande quantidade (BREUSEGEM et al., 2001; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Quando existem interações incompatíveis, como na RH, onde há interação entre o gene de avirulência do patógeno e o gene de resistência do hospedeiro, um primeiro 'burst' oxidativo ocorre dentro da primeira hora do reconhecimento do componente avirulento. Após quatro horas de incubação, um segundo 'burst' oxidativo ocorre de uma forma mais forte e mais prolongada e é característico das interações incompatíveis. As ERO causam morte celular, quer direta ou indiretamente, sendo que a inibição da geração de superóxido em plantas tem reduzido a morte celular induzida por patógeno (BUCHANAN & GRUISSEM & JONES, 2000).

De Souza (2007) estudou amplamente a produção de ERO em células de *Rubus fruticosus*, na presença das moléculas indutoras AS, F-I e MeJA em diferentes concentrações e tempos de elicitação, e comprovou a capacidade dessas moléculas induzirem a RH nas células. Seus resultados demonstraram que, em concentrações de elicitor até 1 mmol/L e em tempos até 1h, não se tem variações significativas nos efeitos observados. Portanto, escolhemos utilizar o tempo de 30 min de cinética para cada experimento.

Nas Figuras 11 e 12 estão representadas as curvas de liberação de ERO pelas células durante 30 minutos, onde podemos observar valores crescentes de liberação de ERO com o tempo para todas as curvas. Sendo que os valores de emissão de fluorescência, para a elicitação com F-I e MeJA, foram superiores aos obtidos com seus respectivos controles. Porém, com AS houve uma diminuição de fluorescência em relação ao controle. Avaliando a velocidade de liberação de ERO, quando aplicamos MeJA no meio reacional, verificamos um aumento de 350% na velocidade em relação ao controle DMSO. As análises dos efeitos de AS e F-I demonstraram que AS provoca uma pequena diminuição (14,2%) e F-I um acréscimo

(5,4%) em relação ao controle (H₂O), como pode ser observado nas Figuras 13 e 14. Portanto, MeJA foi mais efetivo na indução da liberação de erro.

Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por De Souza (2007) nos experimentos de elicitação com esses elicitores, onde demonstrou que as células elicidadas com F-I durante 1 hora apresentaram valores de produção de ERO maiores que as células elicidadas durante 24 horas. A detecção de ERO mostrou não ser dose dependente para concentrações menores do que 1 µmol/L, pois seus resultados ficaram próximos entre si. Além disso, ele demonstrou a capacidade dessas moléculas induzirem a resposta de hipersensibilidade (RH) nas células, provocando o aumento da produção de ERO em células de *Rubus fruticosus* na presença das moléculas indutoras F-I, AS e MeJA.

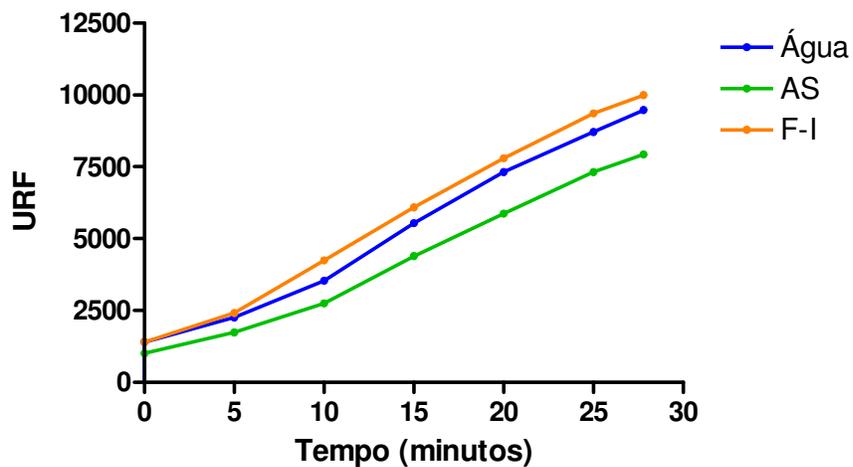


Figura 11. Liberação de ERO durante 30 minutos em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias na presença de F-I (1 $\mu\text{mol/L}$), AS (1 $\mu\text{mol/L}$) e o controle (H_2O).

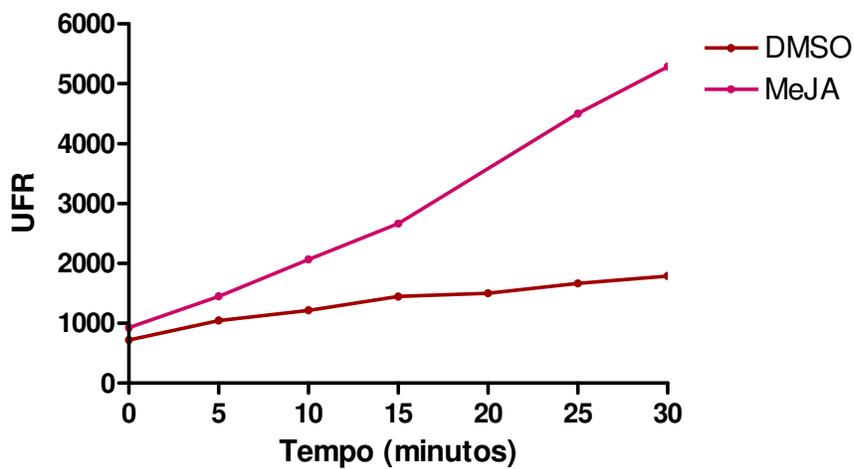


Figura 12. Liberação de ERO durante 30 minutos em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias na presença de MeJA (1 $\mu\text{mol/L}$) e o seu controle (DMSO).

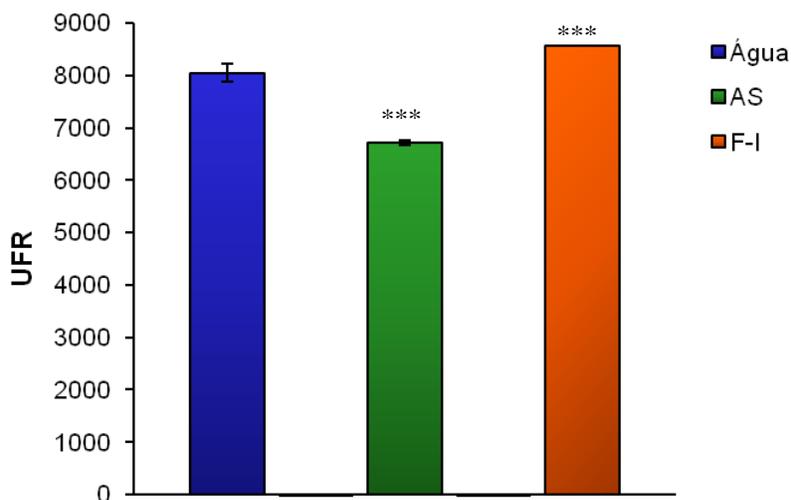


Figura 13. Produção de ERO após 30 minutos em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias na presença de F-I (1 μmol/L), AS (1 μmol/L) e o seu controle (H₂O); *** (**p<0,001**) nível de significância em relação ao controle.

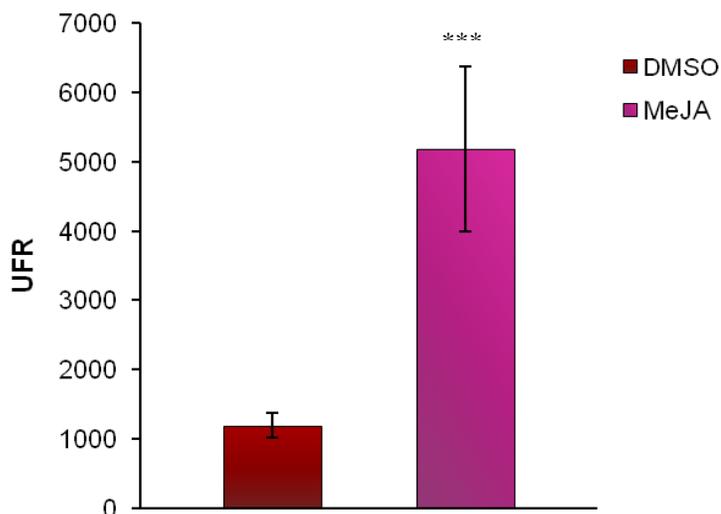


Figura 14. Produção de ERO após 30 minutos em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias na presença de MeJA (1 μmol/L) e o seu controle (DMSO); *** (**p<0,001**) nível de significância em relação ao controle.

4.2.2- Análise dos Componentes da Parede Celular (Fração P)

A Fração P, obtida por elicitação com os diferentes indutores, permaneceu durante 4 horas na estufa na temperatura de 37°C, sendo determinada sua massa seca antes da hidrólise, redução e acetilação para determinação de sua composição monossacarídica. Os resultados estão apresentados na Tabela 3, onde se verifica que há uma maior massa em relação ao controle (H₂O) das frações obtidas a partir da elicitação com F-I e AS, com um aumento de 18,0 e 27,3%, respectivamente. Porém, a fração elicitada com MeJA tem uma diminuição 16,3% em sua massa em relação ao seu controle DMSO.

Tabela 3. Massa de parede celular de *Rubus fruticosus* obtida após os ensaios de elicitação.

Elicitor	H ₂ O	F-I	AS	DMSO	MeJA
Massa (mg/amostra)	303,5	358	386,5	422	353

O principal carboidrato da parede celular é a celulose que representa cerca de 15 até 30% da massa seca das paredes celulares primárias e uma porcentagem maior nas paredes secundárias (DELMER; AMOR, 1995; SOMERVILLE, 2006). As elicitações são responsáveis por alterações nas paredes celulares, por induzirem as diferentes vias metabólicas.

Os resultados obtidos, isolados, não são capazes de afirmar que a alteração ocorrida foi decorrente da elicitação. No entanto, os resultados anteriores de De Souza (2007) demonstraram também decréscimo 20,2% da massa da parede celular em células de *Rubus fruticosus* elicidadas com MeJA, porém não foi observada variação significativa das amostras elicidadas com AS e F-I (cerca de 1% de aumento de massa), em relação ao seu controle. As variações encontradas podem ser atribuídas a uma melhor padronização das quantidades de células elicidadas, visto que os experimentos de De Souza (2007) foram realizados utilizando-se contagem de células e não massa de células.

Após a determinação da massa seca dessas frações, retirou-se uma alíquota de cada fração que sofreu hidrólise, redução e acetilação para as análises da composição monossacarídica (100 mg).

4.2.1- Análise e Quantificação dos Monossacarídeos da Parede Celular

Os componentes moleculares da parede celular variam em proporção conforme o estágio de desenvolvimento da planta. Pelo fato das paredes celulares dos vegetais apresentarem diversas funções ao mesmo tempo, elas apresentam grande flexibilidade com o máximo de resistência, permitindo um maior controle metabólico, sendo uma região de extrema complexidade. Com isso, o estudo dos carboidratos estruturais da parede celular dos vegetais fornece informações que auxiliam na compreensão das funções específicas determinadas para cada célula de um mesmo vegetal ou ainda de espécies de plantas diferentes (BRAGATTO, 2007).

Estudos demonstraram que o aumento da quantidade de xiloglucanas (XG) interligadas com as microfibrilas de celulose é acompanhado por uma diminuição da rigidez. Assim, a rede de celulose sem a presença de hemicelulose, entre outros compostos químicos, causa um aumento da rigidez da parede celular, comprovando o papel das microfibrilas de celulose. (WHITNEY et al., 1999).

Além disso, durante a resposta de hipersensibilidade, ocorre o aumento de ERO que podem reagir com os açúcares da parede celular provocando alterações nessa parede desencadeada pela infecção (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Em folhas de tomate com lesões, são gerados ERO que atuam como segundo mensageiros para os genes relacionados à defesa das plantas e, conseqüentemente, liberam os OGA (OROZCO-CÁRDENAS; NARVÁEZ-VÁSQUEZ; RYAN, 2001) de seus polissacarídeos pécticos de parede celular, devido o aumento da atividade da enzima poligalacturonase (D'OVIDIO et al., 2004).

As frações P, após serem submetidas à hidrólise, redução e acetilação foram analisadas por GLC e os resultados estão apresentados na Tabela 4. Os principais constituintes, monossacarídeos neutros, obtidos nessa análise da parede celular de células em suspensão de *Rubus fruticosus* foram **glucose** (cerca de 55-61%), seguida pela **arabinose** (cerca de 22-29%) e **manose** (cerca de 13,8-15%). Apresentando, em baixas concentrações, os monossacarídeos: **fucose** (cerca de 0,65-1,2%), **galactose** (cerca de 0,5-0,8%), **xilose** (cerca de 0,5-0,8%) e **ramnose** (aproximadamente 0,5%).

Tabela 4. Percentagem dos principais monossacarídeos neutros que constituem a parede celular de células de *Rubus fruticosus* cultivadas em suspensão, tratada com F-I, AS e MeJA e os seus controles (H₂O e DMSO).

Monossacarídeo	F-I	AS	H ₂ O	MeJA	DMSO
Ramnose	0,48	0,32	0,43	0,54	0,44
Fucose	1,2	0,65	0,81	0,88	0,7
Arabinose	29	22,22	22,68	26,85	27,20
Xilose	0,54	0,55	0,76	0,83	0,4
Manose	14	15,14	15,06	14,04	13,83
Galactose	0,6	0,7	0,79	1	0,80
Glucose	55,5	60,80	59,72	59,18	57

As células tratadas com o elicitor AS tiveram uma diminuição nos teores dos monossacarídeos neutros que se apresentaram em menor concentração, como o ramnose, fucose, xilose e galactose. A elicitação das células com o F-I, por sua vez, resultou no aumento dos monossacarídeos ramnose, fucose e arabinose de parede celular. Os monossacarídeos arabinose, manose e glucose não tiveram alteração significativa com a elicitação com o AS. Porém, as células elicidadas com F-I apresentaram uma queda no valor de glucose comparando-se com o controle (H₂O) (Figuras 15A, B e C).

A elicitação das células de *Rubus fruticosus* com MeJA apresentou aumento de todos os monossacarídeos encontrados em baixas concentrações na parede celular (ramnose, fucose, xilose e galactose) quando comparada com o seu controle (DMSO), porém sem alteração significativa no teor dos monossacarídeos arabinose, manose e glucose (Figuras 16A, B e C).

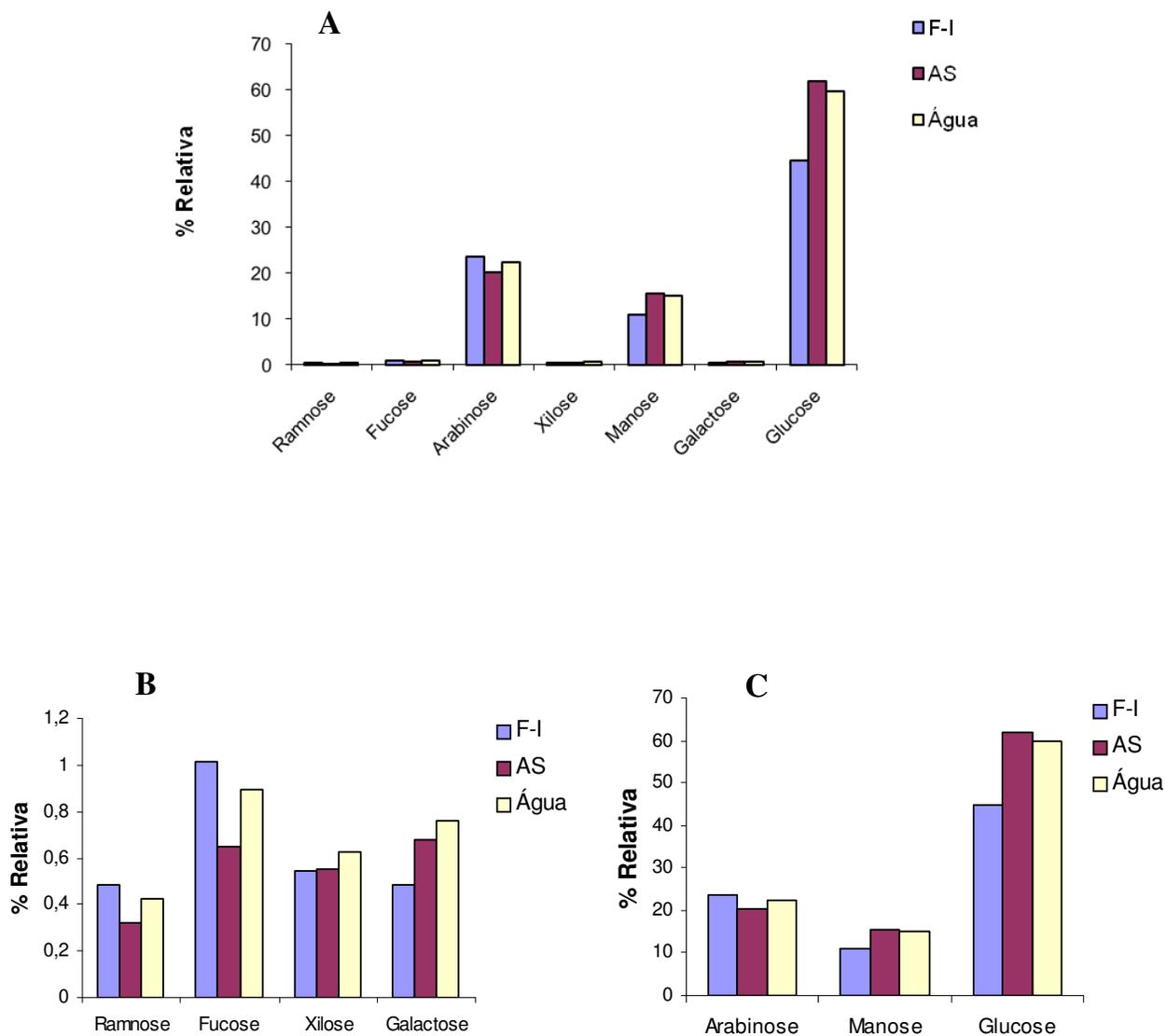
CONTI (2007) demonstrou em seu trabalho a composição dos monossacarídeos da parede celular secundária do xilema de caules de plantas de tabaco transgênicas ou não que mostraram uma maior concentração de D-glucose (cerca de 455 mg/g), seguida de D-xilose (cerca de 225 mg/g), D-manose (cerca de 20 mg/g), D-galactose (cerca de 10 mg/g) e L-arabinose (cerca de 8 mg/g). Na parede celular em tecido parenquimático medular de caules de plantas de tabaco transgênicas ou não, obteve uma maior concentração de D-glucose (cerca de 300 mg/g), seguida de D-galactose (cerca de 25 mg/g), L-arabinose (cerca de 12,5-15 mg/g), D-xilose (cerca de 10-13 mg/g), D-manose (cerca de 10 mg/g). Esses valores demonstram a variabilidade na composição monossacarídica da parede de acordo com a fase de desenvolvimento da planta e o tecido analisado.

Estudos das cascas de uva de três cultivares de *Vitis vinifera* L., Cabernet Sauvignon, Merlot e Shiraz mostraram como polissacarídeos de parede celular mais revelantes: 57-62 mol% de homogalacturonana, 6,0-14 mol% de celulose, 10/11 mol% de xiloglucana, 7 mol% de arabinana, 4,5-5,0 mol% de ramnogalacturonana I, 3,5-4,0 mol% de ramnogalacturonana II, 3 mol% de arabinogalactana e 0,5-1,0 mol% de mananas. Os intervalos indicam pequenas variações na composição entre os três cultivares (ARNOUS; MEYER, 2009).

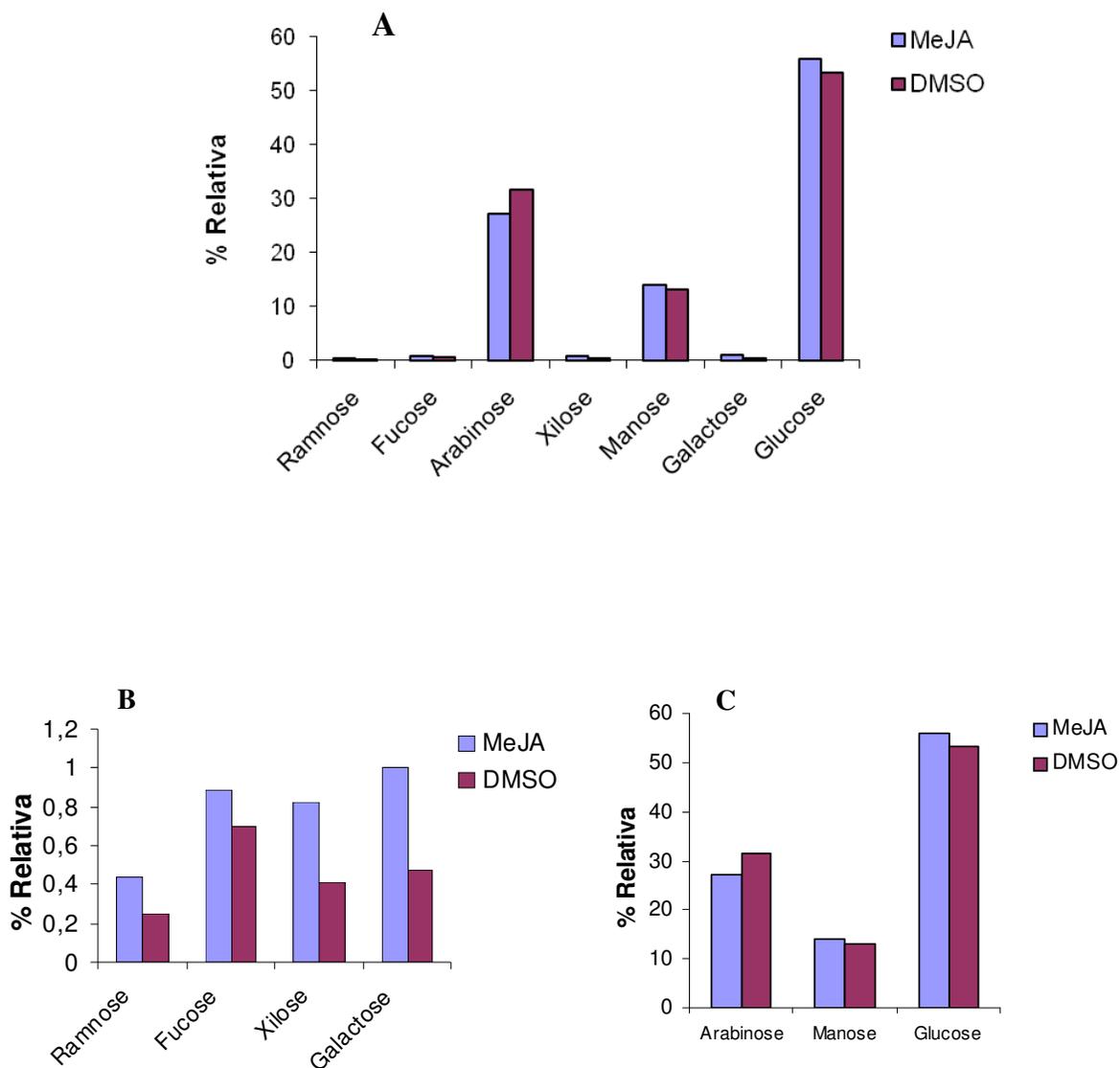
A parede celular do endoderma da mamona (*Ricinus communis*) foi investigada por Zeier et al. (1999) que demonstraram que a massa seca da parede celular corresponde cerca de 19% da massa total celular. Após a hidrólise ácida dessa parede foi verificado que o monossacarídeo mais abundante foi a glucose (40,4%), seguida da arabinose (31,1%), xilose (9,8%), galactose (7,8%), manose (6,7%) e ramnose (4,1%).

Hamann e seus colaboradores (2009) estudaram a resposta ao estresse em plântula de *Arabidopsis thaliana* que apresentam inibição de biossíntese de celulose, afetando a integridade da parede celular. Plantas com inibição da síntese de celulose demonstraram alterações na expressão de genes envolvidos na resposta ao micróbio, na biossíntese de polissacarídeos de parede celular e lignina. Ocorreu também ativação de gene da UDP-D-xilose 4-epimerase relacionado com o aumento de arabinose e ácido urônico em parede celular. Além disso, as plantas com inibição de celulose apresentaram um aumento de AJ e AS que foi dependente da disponibilidade de açúcares e inibida pela pressão osmótica. Seus resultados demonstraram que a relação glucose/sacarose e a pressão de turgor são componentes críticos na manutenção e integridade da parede celular e para a biossíntese AJ.

Pelas proporções relativas entre os monossacarídeos, após 1 hora de elicitação, podemos verificar um aumento de hemicelulose e uma diminuição de celulose mediada por F-I. A elicitação com MeJA não alterou a proporção de celulose, porém aumentou fortemente o teor de hemiceluloses. O AS apresentou alteração, principalmente, na proporção relativa de fucose o que pode estar relacionada ao afrouxamento da parede celular, para posterior reforçamento.



Figuras 15. Percentual dos monossacarídeos neutros de parede celular de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com F-I, AS e MeJA. **A)** Representação de todos os monossacarídeos; **B)** Representação dos monossacarídeos encontrados em baixa concentração; **C)** Representação dos monossacarídeos encontrados em alta concentração.



Figuras 16. Percentual dos monossacarídeos neutros de parede celular de células de *Rubus fruticosus* elicidadas com F-I, AS e MeJA. **A)** Representação de todos os monossacarídeos; **B)** Representação dos monossacarídeos encontrados em baixa concentração; **C)** Representação dos monossacarídeos encontrados em alta concentração.

4.3. Análise dos Componentes Liberados para o Meio Extracelular (Fração E) por Células de *Rubus fruticosus* Elicitadas com AS, F-I e MeJA

4.3.1- Determinação do Teor de Açúcares Redutores e Avaliação por CLAE dos Carboidratos Extracelulares (Fração E)

A agressão da parede celular de uma planta libera fragmentos de parede que, dependendo do tamanho da cadeia de açúcares, ativa resposta de defesa ou induz a morte celular. Esses fragmentos são capazes de estimularem a despolarização da membrana, o *burst* oxidativo, síntese de proteínas relacionadas à defesa, lignina e etileno (ANNIS; GOODWIN, 1997, DE LORENZO et al., 1997, LANG; DORNENBURG, 2000).

Os resultados obtidos dos teores de açúcar redutor das amostras elicitadas em relação aos seus controles não apresentaram significância estatística entre os seus teores médios (Figuras 17 e 18). Análise por CLAE da percentagem relativa dos fragmentos de açúcar liberados para a fração E, Tabela 5, mostraram que a elicitação com F-I apresentou um pico em 2'35'' (92,34%) correspondente a dissacarídeos, além de 6,36% de pentassacarídeo e 1,3% de trissacarídeo. A presença de AS mostrou um perfil de 98,7% de dissacarídeo e 1,3% de trissacarídeo, enquanto o controle (H₂O) apresentou 65,2% de dissacarídeo e 34,8% de pentassacarídeo. A elicitação com MeJA apresentou um pico de 8'53'' (90,7%), característico de pentassacarídeos, não apresentando no seu controle (DMSO). Além disso, a elicitação com MeJA liberou 5,8% de dissacarídeo e 3,5% de trissacarídeo e o DMSO apresentou 86,9% de dissacarídeo e 13,1% de trissacarídeo.

Nossos resultados revelaram que os elicitores F-I e AS agem na parede celular da planta, durante as respostas de defesa, induzindo a liberação, principalmente, de dissacarídeos. Enquanto que, o MeJA induz a liberação de cadeia maiores de açúcares, principalmente os pentassacarídeos.

Nossos resultados estão em concordância com os obtidos no trabalho de De Souza (2007), onde as células de *Rubus fruticosus* elicitadas com F-I, AS e MeJA, em relação aos seus controles (H₂O e DMSO), não demonstraram alteração nos valores dos teores de açúcares redutores e os seus resultados dos fragmentos de açúcar liberados para o meio extracelular foram semelhantes com os realizados durante este trabalho.

As moléculas elicitoras induzem a atividade de enzimas específicas que clivam as ligações dos açúcares de parede celular da planta, provocando a liberação de açúcares (oligossacarídeos) para o meio extracelular que, provavelmente, participam nos mecanismos de resistências nas plantas (DE SOUZA, 2007).

Entretanto, como nesses tratava-se de uma mistura de oligossacarídeos, o teor de açúcares redutores não pode ser usado como parâmetro para definir o perfil de oligossacarídeos obtidos cabendo a análise de CLAE a definição desta mistura.

Tabela 5 - Avaliação por CLAE dos carboidratos componentes das frações extracelulares (Frações E).

Tempos de retenção	Picos	Controle (Água) %	F-I %	AS %	Controle (DMSO) %	MeJA %
2' 35"	Dissacarídeo	65,2	92,34	98,7	86,9	5,8
4' 40"	Trissacarídeo	-	1,3	1,3	13,1	3,5
8' 53"	Pentassacarídeo	34,8	6,36	-	-	90,7

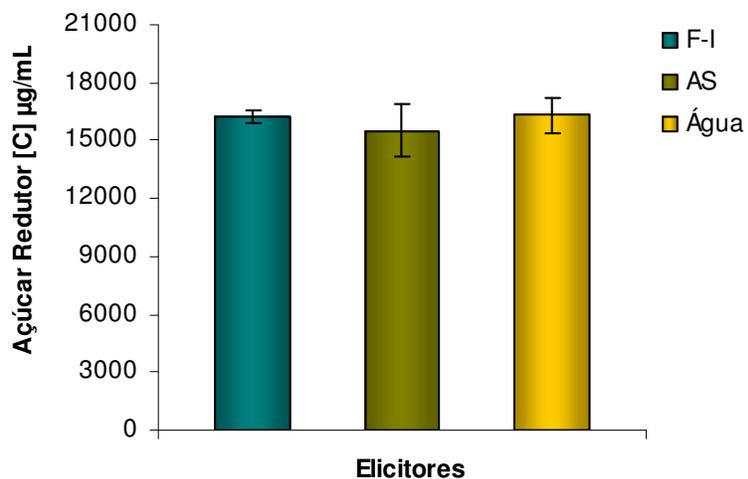


Figura 17. Concentração de açúcar redutor extracelular (Fração E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicitadas com F-I e AS ($1\mu\text{mol/L}$) em relação ao controle (H_2O), com tempo de elicitação de 60 minutos.

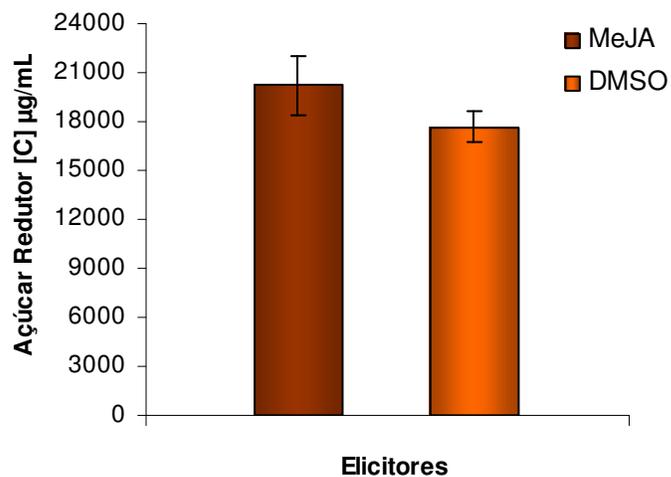


Figura 18. Concentração de açúcar redutor extracelular (Frações E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicitadas com MeJA ($1\mu\text{mol/L}$) em relação ao controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.

4.3.2- Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Extracelulares (Fração E) e Intracelulares (Fração I) Totais

Sabemos que o vegetal em alto nível de estresse, biótico e abiótico, aumenta a produção de metabólitos secundários. Eles se acumulam na parede celular fazendo com que forme uma barreira física que impeça a invasão do agressor (SOARES; MACHADO, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2002) e apresentam um alto potencial antioxidante, apresentando influência na qualidade dos alimentos (SOARES, 2002). Portanto, a compreensão do mecanismo de defesa da planta e a biossíntese desses compostos é de extrema importância para a aplicação na agricultura.

Neste trabalho foram analisadas apenas alterações quantitativas dos compostos fenólicos encontrados na fração I e fração E. A Figura 19 nos mostra que durante a elicitação com AS e F-I, o teor de compostos fenólicos extracelulares, aumentou (56,6% e 17,15%, respectivamente) quando comparamos com o seu controle. Entretanto, o MeJA não apresentou variação na concentração de compostos fenólicos extracelulares em relação ao seu controle (Figura 20).

Na Figura 21 podemos observar que durante elicitação com F-I e AS o teor de compostos fenólicos intracelulares, diminuiu (17,8% e 14,7%, respectivamente) quando comparamos com o seu controle. No entanto, a indução de células com o MeJA não apresentou variação na concentração de compostos fenólicos em relação ao seu controle (Figura 22).

Os valores obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais das frações E apresentaram um decréscimo, quando comparados com as amostras das frações I. Podendo observar que as células de *Rubus fruticosus* armazenam uma concentração maior de compostos fenólicos do que liberam para o meio extracelular.

Nossos resultados demonstraram que as células de *Rubus fruticosus* quando reconhecem a presença de moléculas elicitoras, como AS e F-I liberam os compostos fenólicos para o meio extracelular para se proteger de microrganismos invasores.

Em *Rubus fruticosus* foram encontrados diversos compostos fenólicos, incluindo principalmente os flavonóides e os taninos (ex: ácido elágico) (WANG et al., 1994). Em sua cultura de células foi demonstrado que os oligossacarídeos de *Fusarium oxysporum* apresentam atividade elicitora. Foi sugerido que essa molécula sinalizadora atua na via dos fenilpropanóides, ativando a enzima FAL (NITA-LAZAR et al., 2004).

É sugerido, por Ishihara et al. (1999), que as enzimas participantes das vias de produção dos compostos fenólicos, possivelmente, são ativadas por tratamento com elicitores.

Salgado (2004) sugere que as diferenças entre as espécies de plantas suscetíveis e resistentes estão relacionadas com as diferentes concentrações de compostos fenólicos produzidos pelas células vegetais.

Bi e colaboradores (2007) estudaram os efeitos da aplicação exógena de MeJA e metil salicilato (MeAS) na cultura de *Oryza sativa* (plantas de arroz) e perceberam que estas moléculas elicitoras induziram um aumento de atividades enzimáticas na planta, incluindo a transcrição das enzimas fenilalanina amônia-liase e da cinamato 4-hidroxilase, levando ao aumento da liberação de fenólicos com atividade alelopática.

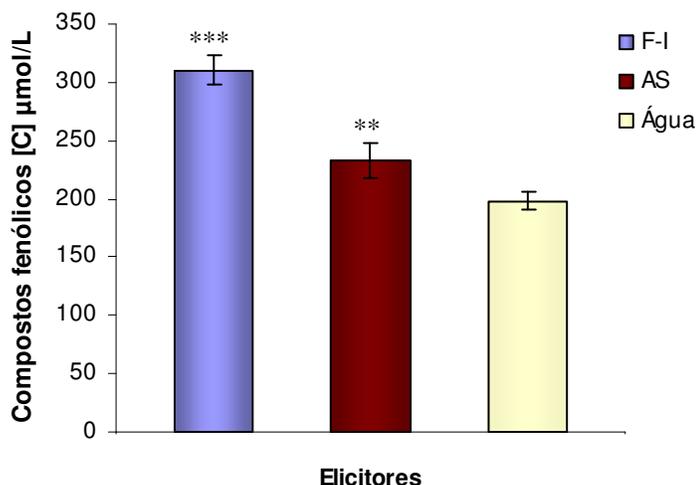


Figura 19. Concentração de compostos fenólicos totais extracelulares (Frações E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicidadas com F-I e AS (1µmol/L) em relação ao controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos; *** (p<0,001) e ** (p<0,01) níveis de significâncias em relação ao controle (H₂O).

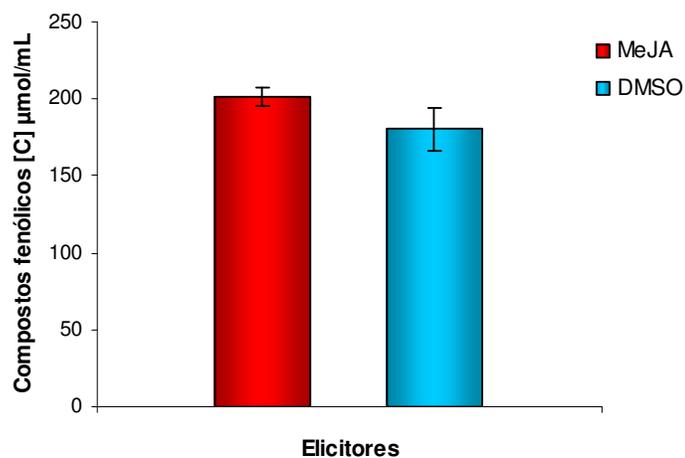


Figura 20. Concentração de compostos fenólicos totais extracelulares (Frações E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicidadas com MeJA (1µmol/L) em relação ao controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.

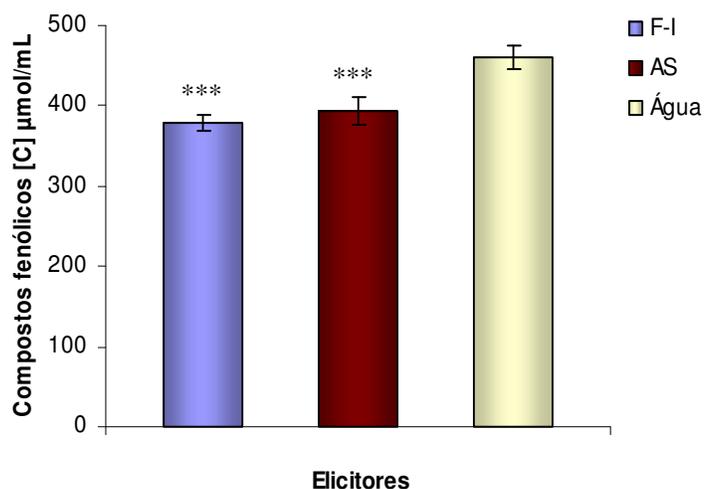


Figura 21. Concentração de compostos fenólicos totais intracelulares (Frações I). A fração I foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicidadas com F-I e AS (1µmol/L) em relação ao controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos; *** (**p<0,001**) nível de significância em relação ao controle (H₂O).

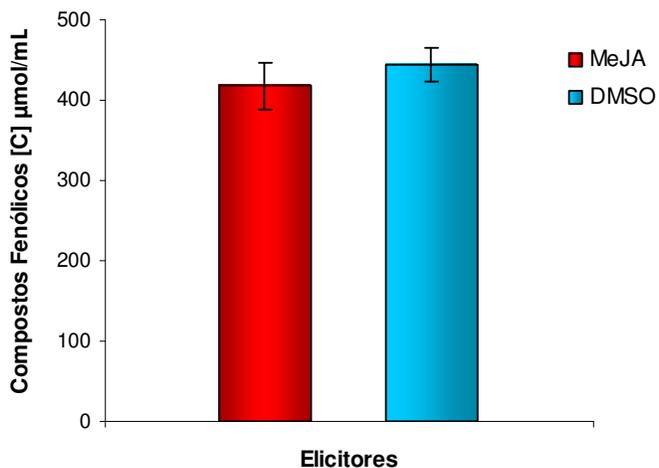


Figura 22. Concentração de compostos fenólicos totais intracelulares (Frações I). A fração I foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicidadas com MeJA (1µmol/L) em relação ao controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos.

4.3.3- Determinação do Teor de Proteína Extracelulares (Fração E) e Intracelular (Fração I)

As proteínas estão envolvidas em muitos eventos celulares relacionados a mecanismos de defesa. Após a interação planta-patógeno, as células hospedeiras sintetizam várias moléculas para tentar impedir a proliferação do agressor como proteínas-quinases e fatores de transcrição, transmitindo o sinal para ativar as cascatas das vias sinalizadoras de resposta de defesa (KOTCHONI; GACHOMO, 2006).

Dentre as proteínas envolvidas em mecanismos de defesa da planta encontram-se as proteínas-RP, como a $\beta(1-3)$ glucanase (laminarinase), a quitinase e a galacturonase. Podendo incluir ainda àquelas envolvidas na degradação da parede celular da própria planta como: fucosidase, xilosidase, galactosidase e glucosidase.

Nas Figuras 23 e 24 podemos observar que a concentração de proteínas totais aumentou com a aplicação de MeJA (12,7%) e F-I (8,6%) na concentração de $1\mu\text{mol/L}$ durante 1 hora, nas células de *Rubus fruticosus*, o que sugere que essas moléculas são capazes de induzir a expressão e a excreção de proteínas nesse sistema celular. No entanto, a aplicação de AS, nas condições experimentais, não alterou significativamente a concentração de proteínas totais.

A concentração de proteínas totais intracelulares (Figuras 26) apresentou um pequeno aumento na presença de MeJA. Porém, a aplicação de F-I e AS não apresentaram alterações em tais condições (Figura 25).

Lepka et al. (1999), em estudos realizados com plantas de vinca e de tabaco infectadas por patógeno, demonstraram que não ocorreu alteração na concentração de aminoácidos nessas plantas. Porém, Junqueira (2003) comprovou o aumento na concentração de proteínas totais em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho.

Trabalhos na literatura garantem que o AJ induz a expressão de genes de defesa de plantas responsáveis pela síntese de proteínas específicas induzidas por jasmonatos (SLESÁK et al., 2001).

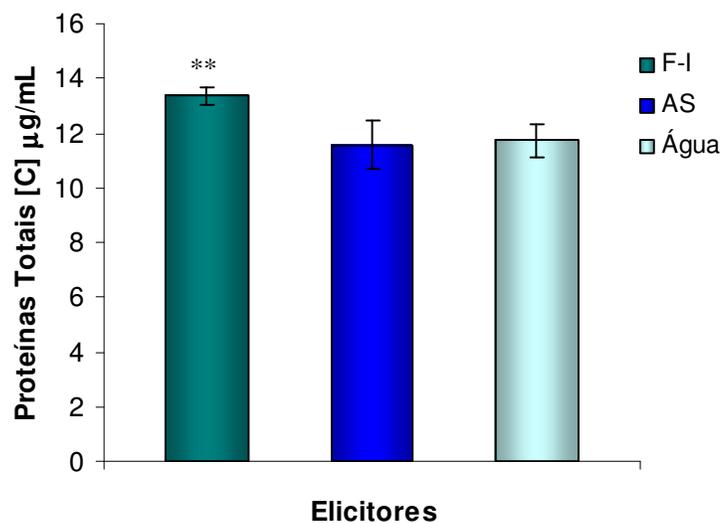


Figura 23. Concentração de proteínas totais extracelulares (Fração E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicitadas com F-I, AS (1µmol/L) e o controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos; ** ($p<0,01$) nível de significância em relação ao controle (H₂O).

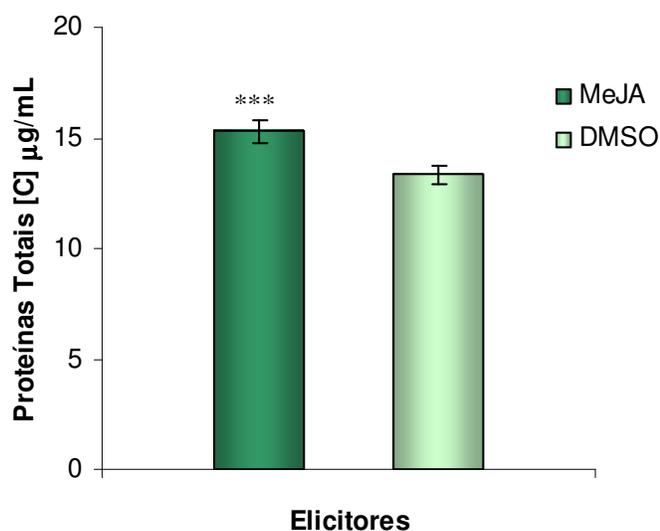


Figura 24. Concentração de proteínas totais extracelulares (Fração E). A fração E foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicitadas com MeJA (1µmol/L) e o controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos; *** ($p<0,001$) nível de significância em relação ao controle (DMSO).

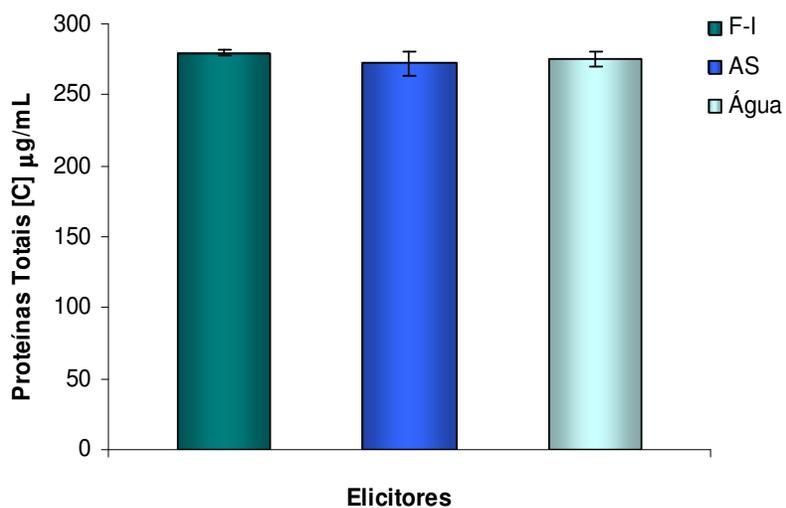


Figura 25. Concentração de proteínas totais intracelulares (Fração I). A frações I foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicidadas com F-I, AS (1µmol/L) e o controle (H₂O), com tempo de elicitação de 60 minutos.

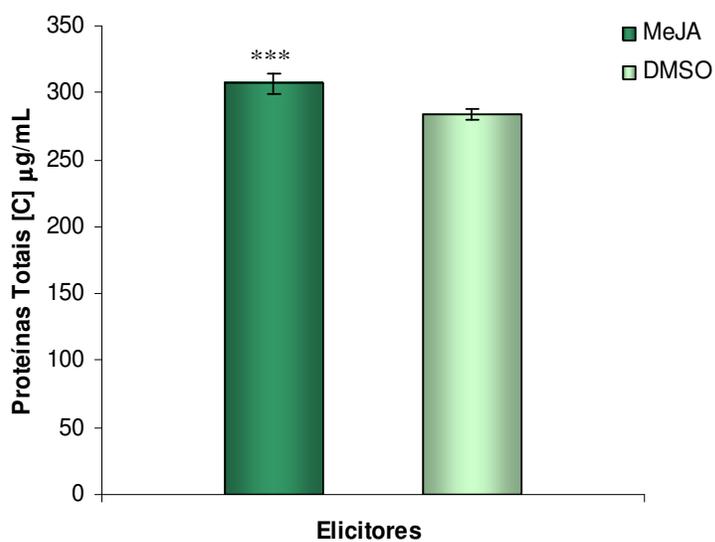


Figura 26. Concentração de proteínas totais intracelulares (Fração I). A frações I foi obtida da cultura de células de *Rubus Fruticosus* elicidadas com MeJA (1µmol/L) e o controle (DMSO), com tempo de elicitação de 60 minutos; *** ($p < 0,001$) nível de significância em relação ao controle (DMSO).

4.3.3.1- Determinação das Enzimas da Fração Extracelular (Fração E)

Segundo Junqueira (2003), os efeitos biológicos e químicos mais estudados do sistema de defesa da planta estão relacionados com as alterações hormonais, produção de toxinas, comprometimento da translocação de seiva pelos vasos do floema e redução na translocação de carboidratos e de nitrogênio. Pouca atenção se dá sobre as alterações das atividades enzimáticas, principalmente àquelas que participam da interação planta-patógeno.

Sabemos que a atividade das rotas metabólicas envolvidas na defesa das plantas é aumentada quando suas células são expostas a um agente indutor. As células infectadas são capazes de emitir sinais bioquímicos a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado, gerando um aumento na síntese das enzimas que estão envolvidas em mecanismos de defesa do vegetal.

A nossa avaliação iniciou-se por algumas das enzimas de degradação da parede celular, β -D-galactosidase, β -D-glucosidase, β -D-xilosidase, α -L-fucosidase e galactorunase, (PIETERSE, 1998; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Seguida das enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos, como proteínas-RP: β (1-3) glucanase (laminarinase), classificada como RP-2; (2) quitinase, classificadas em RP-3, RP-4, RP-8 e RP-11 (GOZZO, 2003).

4.3.3.2- Análise da Atividade da β -D-Galactosidase

A atividade β -D-galactosidase foi medida na fração E, após as células de 18 dias de *Rubus fruticosus* terem sido induzidas por moléculas do polissacarídeo ácido (F-I), o ácido salicílico (AS) e o metil jasmonato (MeJA). A atividade da galactosidase com o AS e F-I está representada nas curvas mostradas na Figura 27. Quando comparamos as curvas obtidas com os dois elicitores e aquela de seu controle (H_2O), observamos um decréscimo na atividade da enzima galactosidase extracelular.

A Figura 28 apresenta o resultado da velocidade da β -D-galactosidase extracelular de células de *Rubus fruticosus* elicitada com MeJA. Foi observado um aumento dessa velocidade em função do tempo, tanto para o MeJA como para seu controle.

Esses resultados demonstraram que as células de *Rubus fruticosus* na presença de AS e F-I sofreram uma inibição da liberação da enzima β -D-galactosidase para o meio extracelular. Visto que, nas condições realizadas nesse trabalho, a velocidade enzimática diminuiu em 60 e 40,4% respectivamente, em relação ao controle. A atividade enzimática com MeJA resultou em um aumento de cerca de 300%, em relação ao seu controle (Figura 29).

Nosso resultado demonstra que o MeJA é capaz de ativar via de defesa de células de *Rubus fruticosus* relacionada com a liberação da β -D-galactosidase para o meio extracelular. O ácido jasmônico e seu metil éster (MeJA) pode atuar como hormônios de senescência nas células das plantas, por serem reguladores endógenos do crescimento e desenvolvimento de plantas (MASON; MULLET, 1990). A β -D-galactosidase além de participar do mecanismo de defesa da planta, pode participar do crescimento das células.

Ryals et al. (1996) estabelece que a rapidez e intensidade com que a planta detecta e responde a presença do patógeno determina a resistência ou não a doença. Assim, durante o percurso da indução com AS e F-I das células de *Rubus fruticosus*, efetivas isoformas das hidrolases podem não ter sido sintetizadas em quantidade suficientes, no tempo e local correto.

Brandão et al. (2009) estudou a relação da auxina que é responsável para controlar o nível de enzimas hidrolíticas de xiloglucana, no armazenamento xiloglucana de parede celular durante o crescimento de plântula de *Hymenaea courbaril*. Os genes de xiloglucana transglicosilase hidrolase (HcXTH1) e β -galactosidase (HcBGAL1) foram relacionados com a degradação de xiloglucana e responderam a auxina e luz. Isso sugere que auxina e a luz estão envolvidas no controle da expressão de genes relacionados ao armazenamento xiloglucana mobilização em plântulas de *Hymenaea courbaril*.

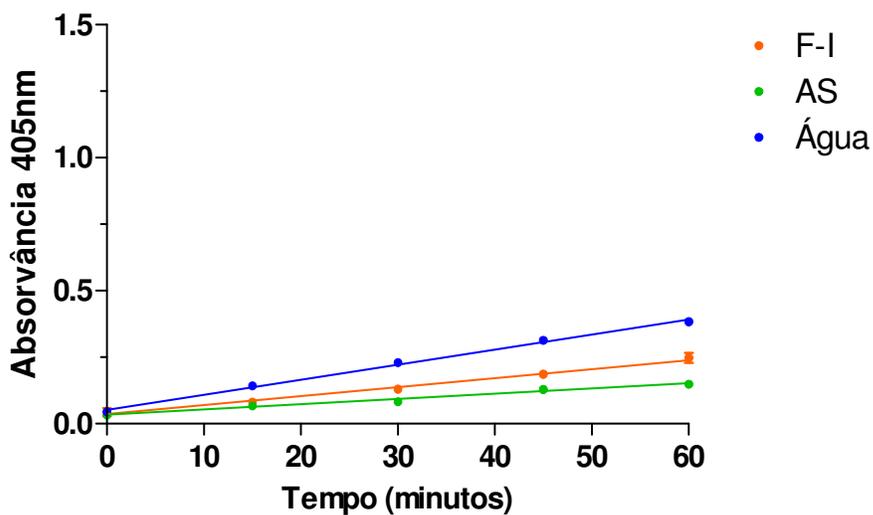


Figura 27. Curva da atividade da enzima β -D-galactosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com F-I, AS e o controle (H_2O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

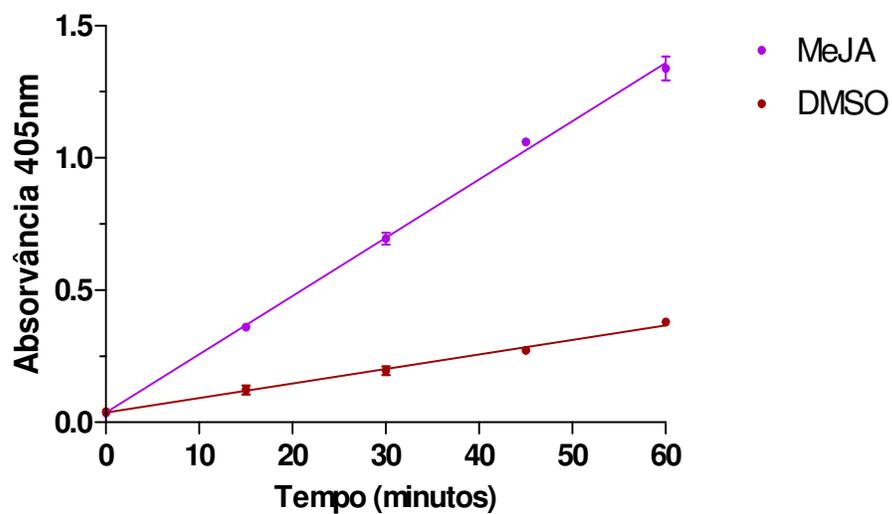


Figura 28. Curva da atividade da enzima β -D-galactosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

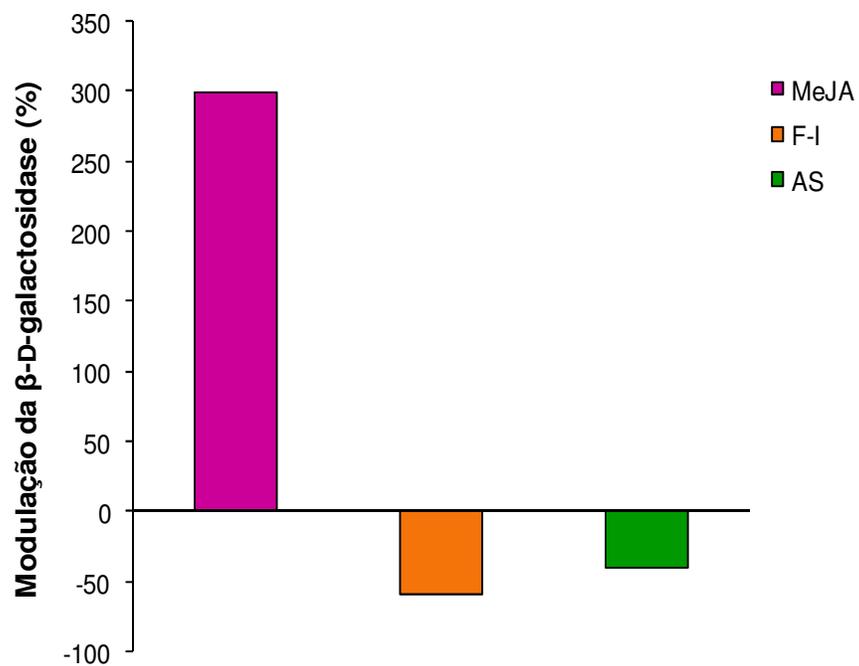


Figura 29. Representação percentual da velocidade enzimática da β -D-galactosidase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 μ mol/L em células de *Rubus fruticosus* correlacionada com o seu controle (H_2O e DMSO).

4.3.3.3- Análise da Atividade β -D-Glucosidase

A elicitação das células de 18 dias de *Rubus fruticosus* com AS e F-I (nas concentrações de $1\mu\text{mol/L}$) como elicitores aplicados separadamente, durante 1 hora, não demonstrou efeito sobre a atividade β -D-glucosidase, na fração E, quando comparados com os resultados para o controle (Figura 30).

Esse resultado mostra que as células de *Rubus fruticosus* na presença de AS e F-I não induzem a liberação da enzima β -D-glucosidase para o meio extracelular, em tais condições.

Os resultados com MeJA estão representados nas Figuras 31 e 32 que mostraram que o MeJA liberou para o meio extracelular a enzima β -D-glucosidase, sendo que a velocidade enzimática foi estimulada em 230% na presença do MeJA, quando comparamos com o seu controle (DMSO).

Estudos realizados com tomates mutantes comprovam a importância do MeJA no mecanismo de defesa da planta. Plantas que apresentavam deleções em genes responsáveis para a rota biossintética do MeJA, quando feridas foram incapazes de produzirem proteínas que participam do mecanismo de defesa das plantas (HOWE et al., 1996).

O MeJA apresenta fórmula molecular semelhante do hormônio envolvido na reação inflamatória dos animais (prostaglandinas) (FARMER; RYAN, 1992). Na literatura é muito evidente a variedade biológica do MeJA, sendo seu efeito dependente da sua concentração nos tecidos vegetais (MASON; MULLER, 1990).

Em nossos estudos com MeJA, em uma concentração de $1\mu\text{mol/L}$, atuando durante 1 hora em células de *Rubus fruticosus* induz a atividade da β -D-glucosidase fortemente. Entretanto, não podemos afirmar se a atividade da β -D-glucosidase ocorreu devido à ativação de genes ou pelas alterações pós-traducionais de proteínas já existentes nas células.

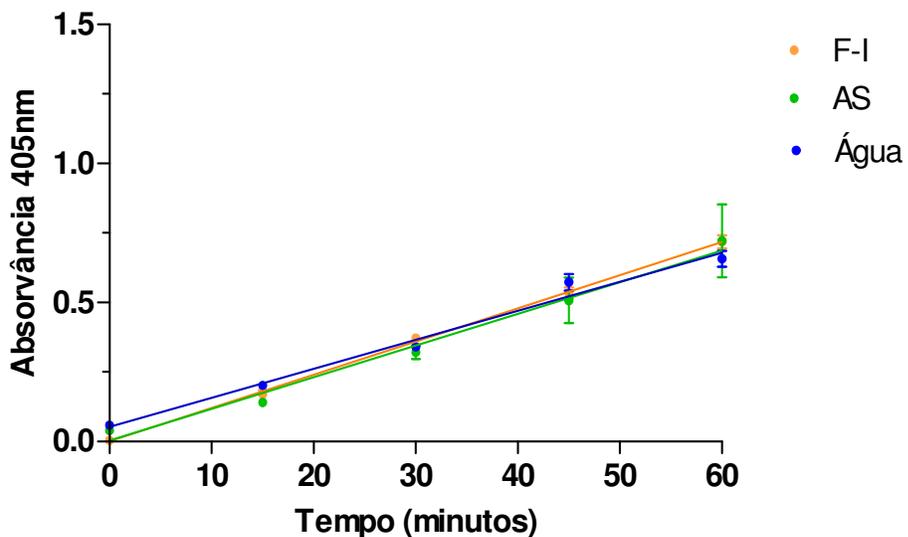


Figura 30. Curva da atividade da enzima β -D-glucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a eliciação com F-I, AS e o controle (H_2O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

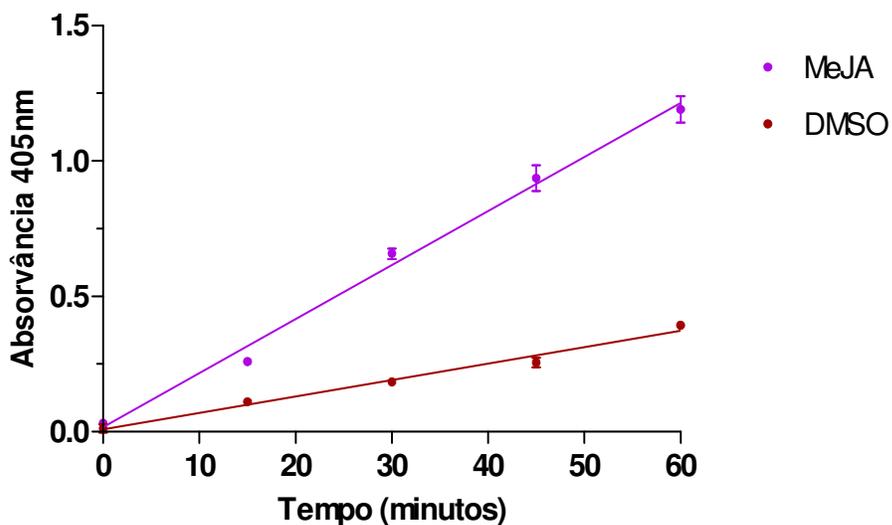


Figura 31. Curva da atividade da enzima β -D-glucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a eliciação com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

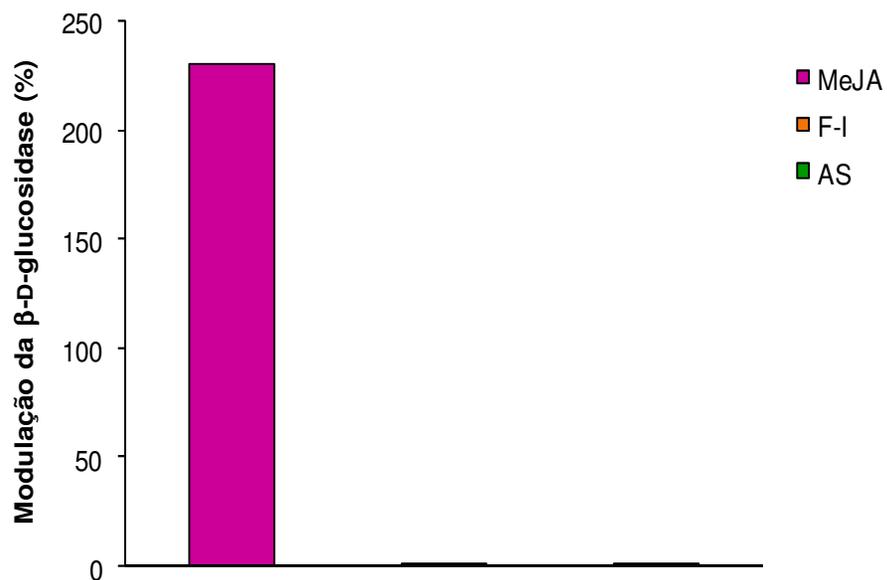


Figura 32. Representação percentual da velocidade enzimática da β -D-glucosidase extracelular. Foi obtida com o tratamento de 1h com o MeJA na concentração de $1\mu\text{mol/L}$ em células de *Rubus fruticosus* correlacionada com o seu controle (DMSO).

4.3.3.4- Análise da Atividade β -D-Xilosidase

A elicitação das células de 18 dias de *Rubus fruticosus* com AS, F-I e MeJA (nas concentrações de 1 $\mu\text{mol/L}$) como elicitores aplicados separadamente, durante 1 hora, não demonstraram efeito sobre a atividade β -D-xilosidase, na fração E, quando comparados com os resultados para os controles H_2O e DMSO.

A Figura 33 representa o resultado da velocidade da β -D-xilosidase extracelular de células de *Rubus fruticosus* elicitada com AS e F-I e a Figura 34 representa o resultado da velocidade da β -D-xilosidase extracelular elicitada por MeJA. Não foi observada atividade enzimática em função do tempo utilizado na cinética.

O aumento da expressão dos genes relacionados à defesa da planta (genes das proteínas-RP) é caracterizado pela resposta sistêmica adquirida, podendo explicar a baixa atividade enzimática de β -D-xilosidase.

Estudo realizado com o hormônio etileno que está envolvido na maturação do pêssego (*Prunus persica* L.) e com a expressão gênica relacionada às atividades das enzimas α -L-arabinofuranosidase e β -D-xilosidase mostra que outros fatores podem desempenhar um papel na expressão, já que ocorre acumulação na transcrição em diferentes tempos e órgãos de desenvolvimento, mesmo com baixa produção de etileno (DI SANTO; PAGANO; SOZZI, 2009).

Foi avaliado a decomposição de madeira com diversas espécies de fungos (*Antrodia macra*, *Antrodia pulvinascens*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis resinascens* e *Dichomitus albidofuscus*) com a produção de diferentes enzimas: lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, endo-(1-4)- β -glucanase, endo-(1-4)- β -xilânase, celobiohidrolase, (1-4)- β -glucosidase e 1,4- β -xilosidase. Os resultados nos mostram que as atividades de β -glucosidase e β -xilósidase foram detectadas em todas as espécies, exceto *Antrodia pulvinascens* que não produziu endoxilânase e *Dichomitus albidofuscus* que não produziu as endoxilânase ou endoglucanase. A atividade de β -xilósidase aumentou com o tempo em *Antrodia macra* e *Ceriporiopsis resinascens*, enquanto permaneceu constante em *Dichomitus albidofuscus* e diminuiu com o tempo em *Antrodia pulvinascens*. (TOMŠOVSKÝ et al., 2009).

Os polissacarídeos de xiloglucana ocorrem em paredes celulares, principalmente em eudicotiledôneas. Necessitam da expressão e ativação de β -D-xilosidase para sua degradação. Acredita-se que a principal função destes polímeros nas paredes celulares seja orientar as

microfibrilas de celulose, assim as xiloglucanas possuem papel fundamental na forma e desenvolvimento celulares (TAIZ; ZEIGER, 2004).

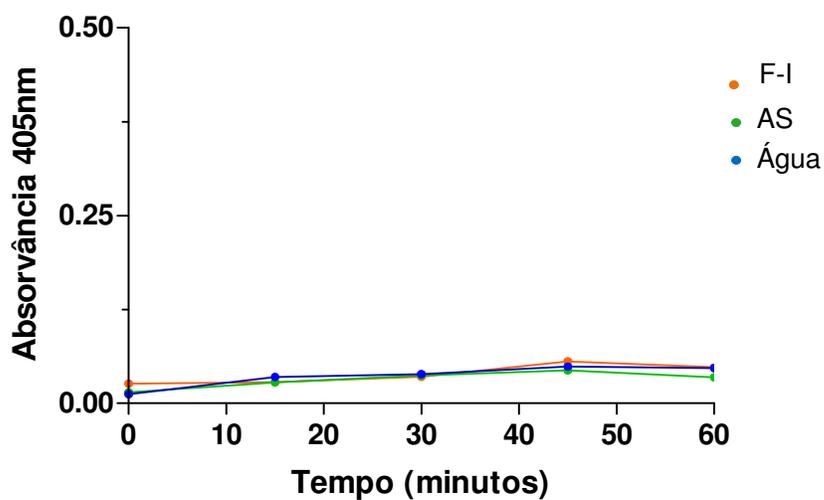


Figura 33. Curva da atividade da enzima β -D-xilosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com F-I, AS e o controle (H_2O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

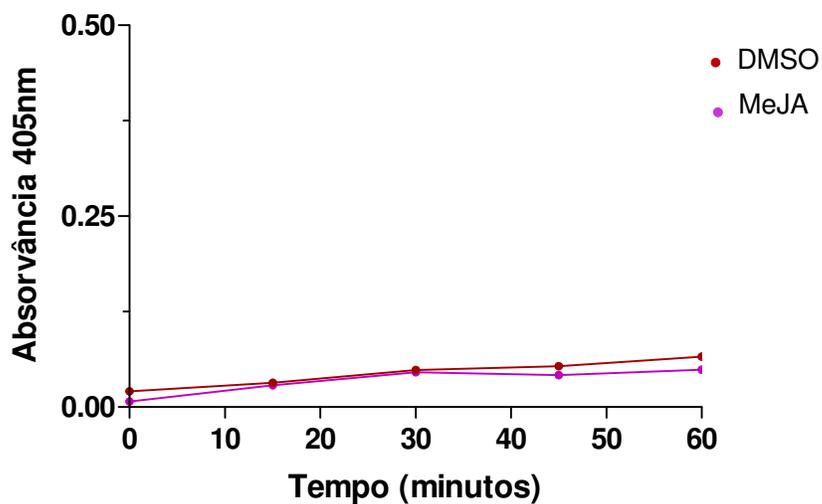


Figura 34. Curva da atividade da enzima β -D-xilosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

4.3.3.5- Análise da Atividade α -L-Fucosidase

De La Torre e colaboradores (2002) estudaram a atividade α -fucosidase em folhas de *Arabidopsis* utilizando fucose marcada ($[^3\text{H}]\text{Fuc}$) e demonstraram que essa enzima tem atividade sobre a fucose do oligossacarídeo XXFG e 2'-fucosil-lactitol, mas não apresentou atividade em *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo. Entretanto, Vargas-Rechia (1998) demonstrou a atividade de uma enzima α -L-fucosidase intracelular em células de *Rubus fruticosus*, após a elicitação com o elicitor XXLGol que mede a respostas de crescimento celular, sendo capaz de hidrolisar o substrato *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo.

Nesse trabalho, estudamos a atividade da α -L-fucosidase da fração E de células de *Rubus fruticosus* utilizando o substrato *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo após a elicitação com F-I, AS e MeJA (Figura 35 e 36, respectivamente). Podemos observar que a α -L-fucosidase extracelular não apresentou atividade no tempo de elicitação de 1h, na presença de F-I e AS representada pela análise da variação da velocidade de liberação do íon fenolato. Porém, na presença de MeJA, este sistema celular demonstrou uma inibição de 16,7% na velocidade de reação em relação ao controle. Provavelmente a baixa atividade detectada, atribui-se a baixa concentração desta enzima no meio extracelular, e não a sua incapacidade de hidrolisar o substrato sintético, visto os resultados obtidos para o controle DMSO e MeJA, representados na Figura 36.

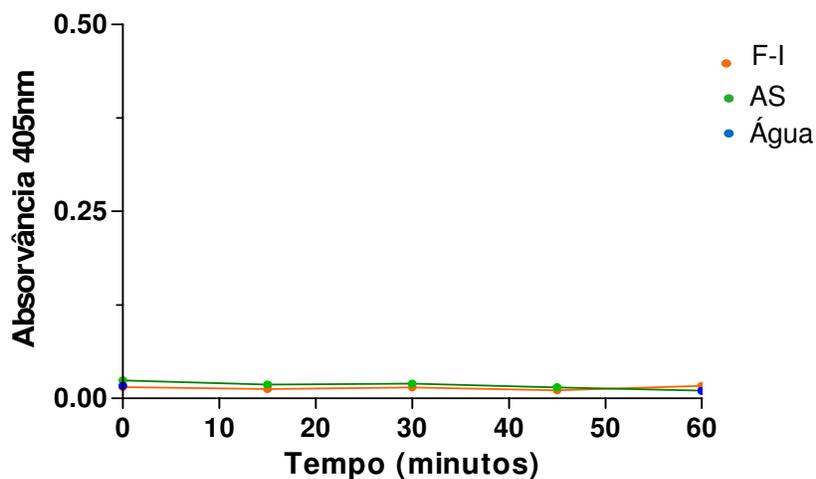


Figura 35. Curva da atividade da enzima α -L-fucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H_2O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

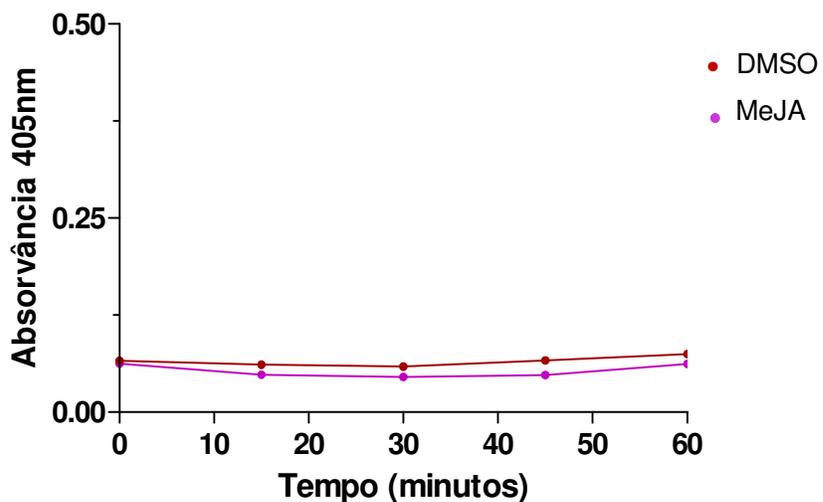


Figura 36. Curva da atividade da enzima α -L-fucosidase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

4.3.3.6- Análise da Atividade da Galacturonase

As Figuras 37 e 38 nos mostram a atividade da enzima galacturonase na presença de F-I, AS e MeJA em relação ao seu controle, respectivamente. Pelos resultados da Figura 37, observa-se haver diferenças significativas nas atividades da enzima galacturonase na presença de F-I e AS quando comparados com seu controle (H₂O). O AS aumentou a atividade da galacturonase de 217,93% e F-I de 62,19 % (Figura 37). A Figura 38 demonstra a atividade da galacturonase na presença do MeJA em relação ao seu controle. Podemos observar que o MeJA foi capaz de inibir a atividade dessa enzima em 401,3% (Figura 39).

O estudo de Pimenta e colaboradores (2000) demonstra que a ação da enzima poligalacturonase na hidrólise das ligações glicosídicas da protopectina, pode ser responsável pela solubilização de pectinas nos frutos de café, assim ocorre o amaciamento desses frutos. Além disso, muitos trabalhos demonstram a importância da galacturonase na defesa da planta e na virulência de diferentes fungos. A inativação de genes responsáveis pela codificação dessa enzima reduz a virulência dos fungos, como *Aspergillus flavus* em algodão, *Botrytis cinerea* em tomate, entre outros (SHIEH et al., 1997; TEN HAVE et al., 1998).

De Souza (2005) mostrou que AS foi capaz de aumentar a atividade da poligalacturonase em concentrações baixíssima e em curto tempo de elicitação (1 nmol/L e 1 h) e o F-I foi capaz de aumentar a atividade enzimática de poligalacturonase durante 1 e 4 h nas concentrações de 1000 nmol/L e 1 nmol/L, respectivamente. No tempo de 2 h não mostrou alteração na atividade enzimática.

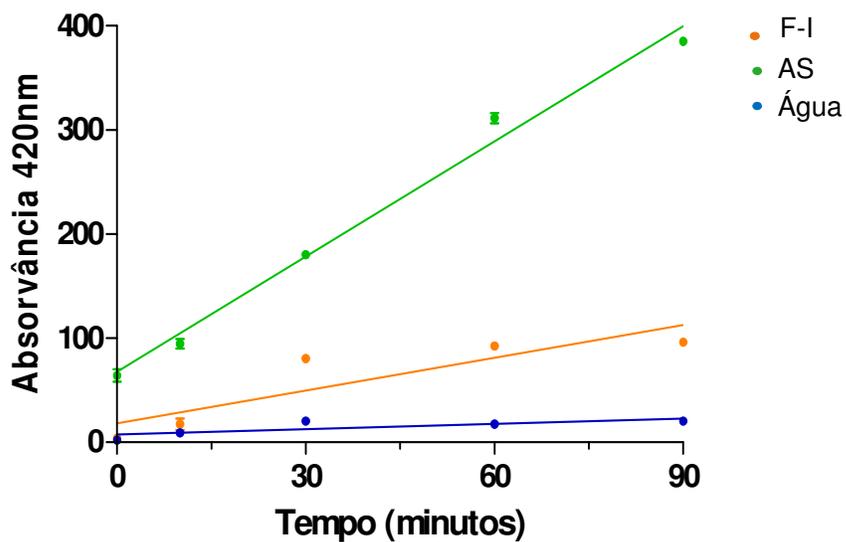


Figura 37. Curva da atividade da enzima galacturonase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com F-I, AS e o controle (H₂O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

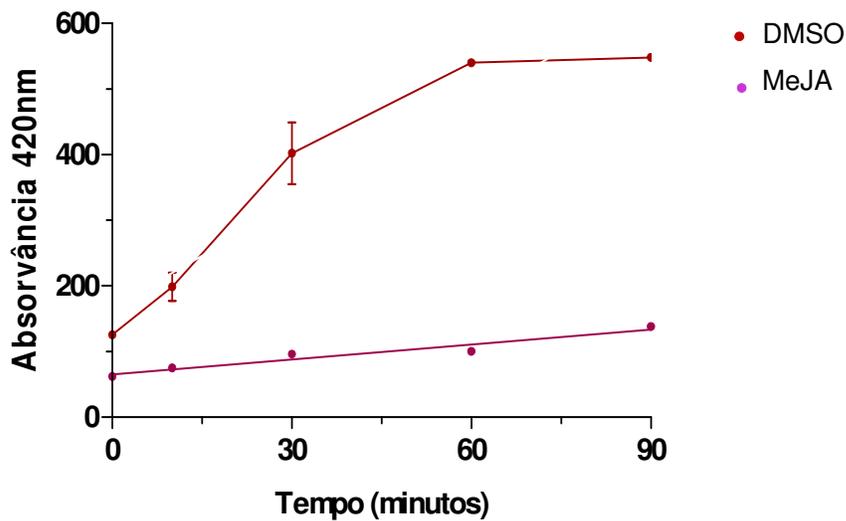


Figura 38. Curva da atividade da enzima galacturonase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

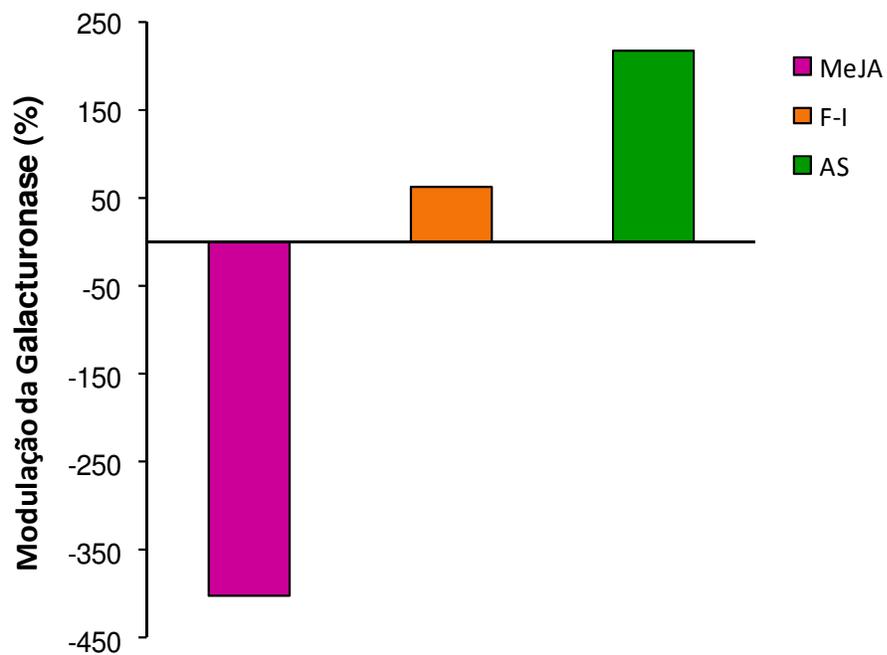


Figura 39. Representação percentual da velocidade enzimática da galacturonase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ em células de *Rubus fruticosus* correlacionada com o seu controle (H_2O e DMSO).

4.3.3.7- Análise da Atividade da β -(1-3)-Glucanase (Laminarinase).

A β (1-3)-glucana é encontrada em microrganismo e plantas como constituintes estruturais de parede celular, como material e substância extracelular. Oligossacarídeos de β -glucana são estudados como elicitores. Em planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi demonstrado o mecanismo de defesa utilizando como elicitor laminarina (linear β (1-3) glucana) que foi extraído e purificado a partir da alga marrom *Laminaria digitata* e comparada com um oligogalacturonídeo. Observou-se que o oligossacarídeo de laminarina, em poucos minutos, provocou liberação de H₂O₂. Depois de algumas horas, apresentou um forte estímulo da atividade de FAL, ácido cafeico *O*-metiltransferase e lipoxigenases, bem como a acúmulo de AS. Nenhum dos dois elicitores induziu danos no tecido ou morte celular (KLARZYNSKI et al., 2000; MÉNARD et al., 2005).

Em nosso trabalho, estudamos a indução da atividade da enzima laminarinase que tem como função atuar em polissacarídeos de β -glucana, após a RH em células de *Rubus fruticosus*.

A atividade da enzima laminarinase na presença de F-I, AS e MeJA está representada nas Figuras 40 e 41. Podemos observar na Figura 42 um aumento de 138,9% da atividade enzimática na presença de MeJA e inibição de aproximadamente 74% e 86,9% na presença de AS e F-I, respectivamente.

De Souza (2005) verificou que a presença de AS (nas concentrações de 10 e 100 nmol/L) em células de *Rubus fruticosus* aumentou a atividade enzimática de laminarinase intracelular após 2 h de incubação. Ainda, ele mostrou que a presença de F-I foi efetivo na elicitação durante 1 e 4 h nas concentrações de 100 nmol/L e 1 nmol/L, respectivamente, sendo que 2 h de indução não provocou efeito na atividade enzimática de laminarinase intracelular.

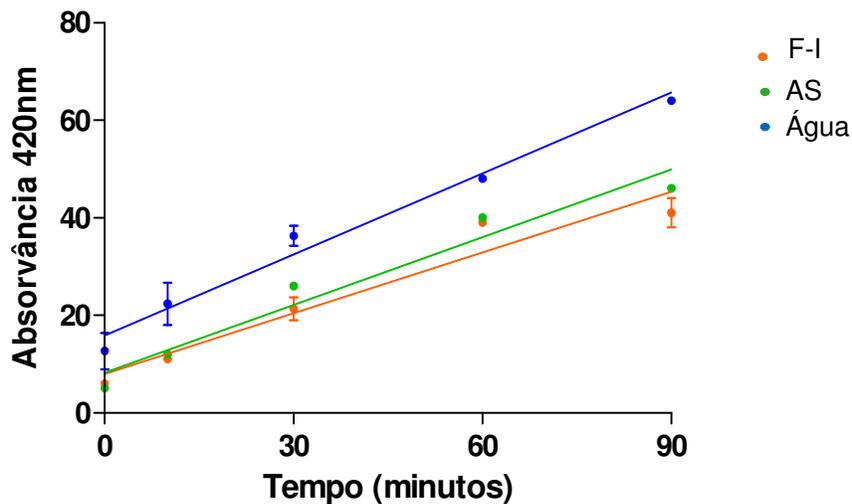


Figura 40. Curva da atividade da enzima laminarinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com F-I, AS e o controle (H₂O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

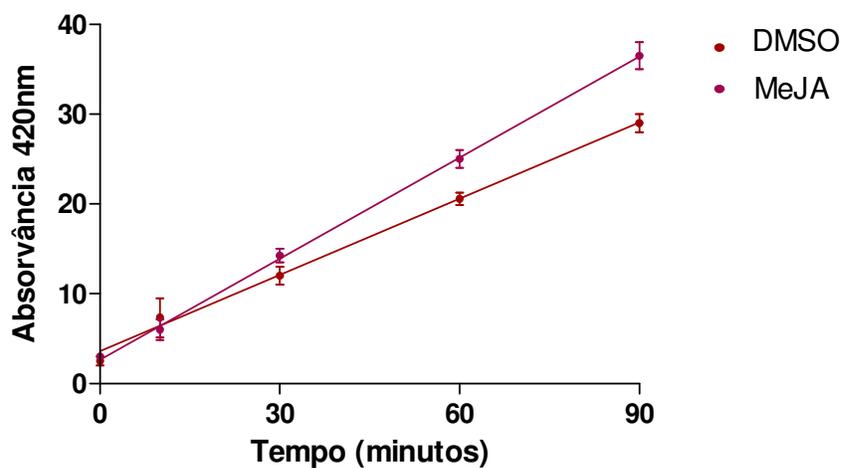


Figura 41. Curva da atividade da enzima laminarinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitção com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

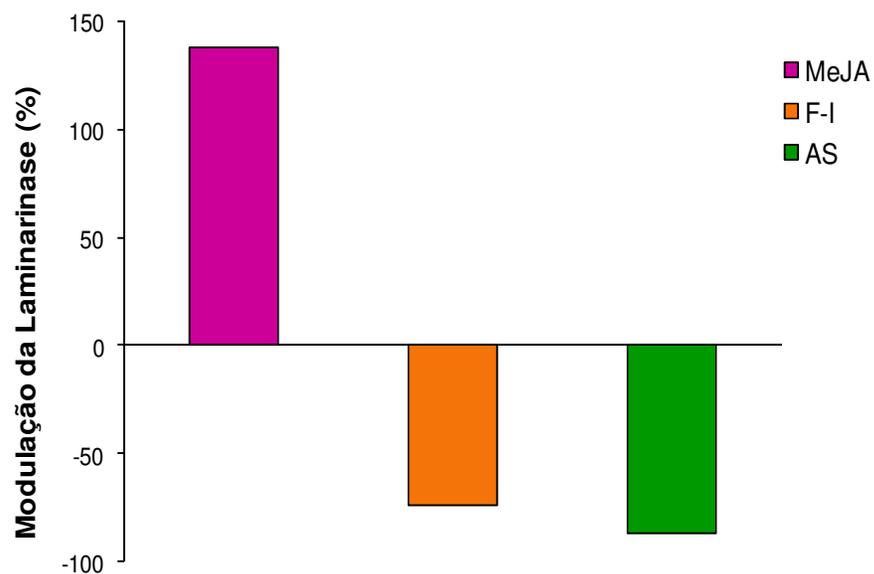


Figura 42. Representação percentual da velocidade enzimática da laminarinase extracelular (Fração E). A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ em células de *Rubus fruticosus* correlacionada com o seu controle (H_2O e DMSO).

4.3.3.8- Análise da Atividade da Quitinase

As bainhas foliares, folhas e raízes de arroz tratadas com AJ exógeno durante 24 a 48 h responderam com a indução e acumulação da enzima quitinases, conforme determinado por análise imunoblot utilizando um anticorpo anti-endoquitinase (Rakwal; Komatsu & Yang, 2004).

De Souza (2005) mostrou que a presença de AS (nas concentrações de 1 a 1000 nmol/L) durante 1 hora em células de *Rubus fruticosus* foi capaz de aumentar a atividade de quitinase intracelular mesmo em concentração muito baixa (1 nmol/L). Na concentração de 1000 nmol/L mostrou um aumento na atividade enzimática de 820% em 1 h de incubação. Entretanto, não mostrou alteração significativa da atividade dessa enzima em outros tempos, exceto de 2 h na concentração de 100 nmol/L. Ainda nesse estudo, De Souza demonstrou que a presença de F-I não foi muito efetivo no aumento da atividade da quitinase intracelular, sendo que após 1 h de incubação houve inibição dessa enzima no meio intracelular em todas as concentrações estudadas (1 a 1000 nmol/L).

As Figuras 43 e 44 representam a atividade da enzima quitinase extracelular na presença de F-I, AS e MeJA. Nos nossos estudos observamos que a atividade da quitinase extracelular aumentou 30,6%, 43% e 253,5% na presença de MeJA, AS e F-I, respectivamente, quando comparado com os seus controles (Figura 45).

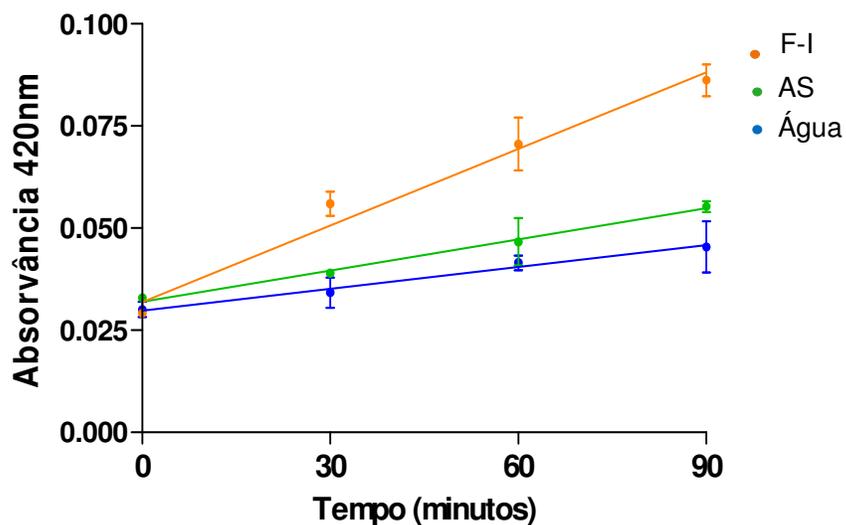


Figura 43. Curva da atividade da enzima quitinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com F-I, AS e o controle (H₂O) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

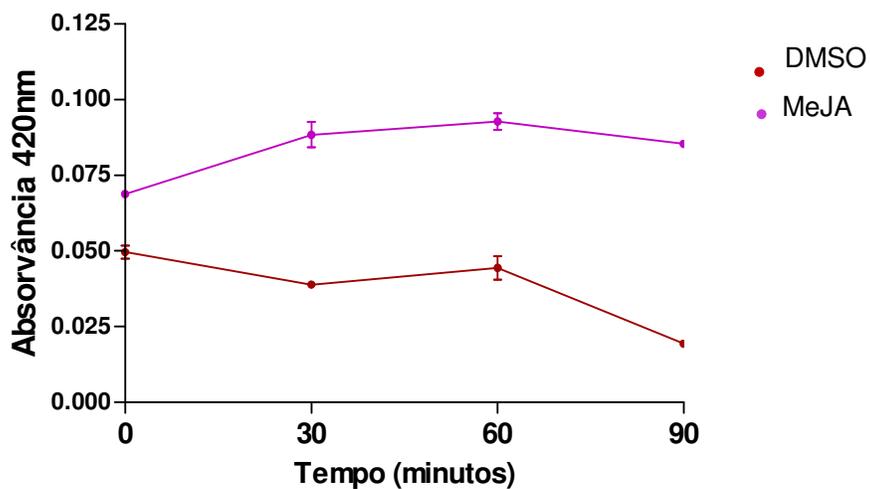


Figura 44. Curva da atividade da enzima quitinase extracelular. A atividade enzimática foi determinada após a elicitação com MeJA e o controle (DMSO) em células de *Rubus fruticosus* de 18 dias.

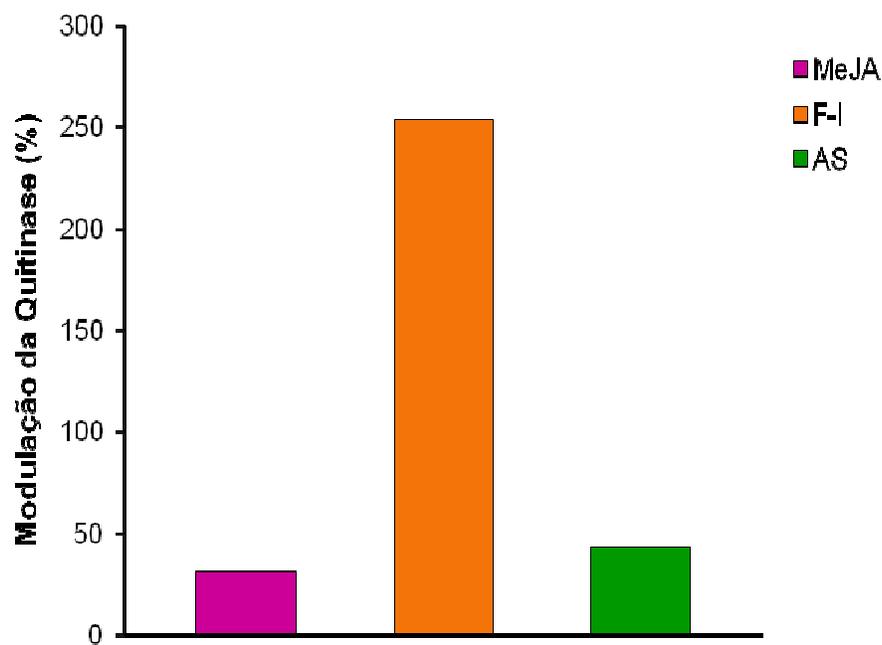


Figura 45. Representação percentual da velocidade enzimática da quitinase extracelular (Fração E) em relação aos controles. A fração E foi obtida após o tratamento de 1h com o F-I, o AS e o MeJA na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ em células de *Rubus fruticosus* correlacionada com o seu controle (H_2O e DMSO).

5- CONCLUSÕES

Nossos resultados, resumidos na Figura 46, mostraram que a aplicação de **F-I** e **AS**, separadamente, na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, após 1h, inibiu as atividades enzimáticas de β -D-galactosidase, laminarinase, induziu as atividades de galacturonase e quitinase. Não alterou a atividade de β -D-glucosidase e α -L-fucosidase, liberou fragmentos de parede, dissacarídeos, que pode estar relacionada à morte celular durante a RH e induziu a liberação de compostos fenólicos para o meio extracelular. Além disso, o **F-I** aumentou a concentração de proteínas totais extracelulares, o percentual de ramnose e fucose, diminuiu o valor de glucose de parede celular e aumentou a produção de ERO durante 30 minutos de incubação. O **AS** foi capaz de diminuir o percentual de ramnose, fucose, xilose e galactose, mas não altera o percentual de arabinose, manose e glucose. A produção de ERO foi inibida na presença de **AS** durante 30 minutos de incubação. O teor de açúcares redutor e a atividade de β -D-xilosidase não apresentaram alterações na presença de **MeJA**, **F-I** e **AS**.

Com isso, **F-I** e o **AS** foram mais efetivos no aumento das atividades enzimáticas relacionadas à defesa da planta que agem nas paredes de diversos fitopatógenos, sendo que as enzimas que podem atuar na parede celular da própria planta mostraram efeito inibitório ou não provocaram alteração. Essas moléculas indutoras aumentam o teor de compostos fenólicos extracelulares que podem agir no fortalecimento da parede da própria planta ou desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres. Aumentaram a liberação de fragmentos de dissacarídeos e o **F-I** aumentou em pequena quantidade a produção de ERO. Podemos sugerir que essas moléculas podem estar relacionadas à ativação do mecanismo de defesa de amora preta, mostrando que o **AS** é mais efetivo em tempo maior de incubação.

A presença de **MeJA**, na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, após 1h, induziu as atividades enzimáticas de β -D-galactosidase, β -D-glucosidase, quitinase e laminarinase e inibiu a atividade de galacturonase e α -L-fucosidase, aumentou a concentração de proteínas totais extracelulares, aumentou o percentual relativo de ramnose, fucose, xilose e galactose e não alterou arabinose, manose e glucose. Além disso, aumentou liberação de fragmentos maiores de açúcares e aumentou a produção de ERO nas células durante 30 minutos de incubação.

Na literatura é muito evidente a variedade biológica do **MeJA**, sendo seu efeito dependente da sua concentração nos tecidos vegetais (MASON; MULLER, 1990). O **MeJA** após 1 hora provocou aumento das atividades enzimáticas (β -D-galactosidase e β -D-glucosidase) que atuam na própria parede da célula da planta, podendo participar do

crescimento celular. Além disso, o **MeJA** induziu a liberação de fragmentos maiores de açúcar, podendo participar do crescimento ou da sinalização celular, e ainda, aumentou o percentual de ramnose, fucose, xilose e galactose, podendo provocar o aumento de hemicelulose de parede celular, provocando uma maior flexibilidade dessa parede, não apresentou variação na concentração de compostos fenólicos, sendo moléculas antioxidantes e aumentou a produção de ERO, podendo provocar a morte celular do fitopatógeno ou da própria célula da planta durante a RH.

MeJA tem efeito maior sobre as enzimas envolvidas na degradação da parede celular, ao mesmo tempo que observa-se um grande aumento do teor de ERO produzidos. Além disso, os fragmentos liberados da parede celular são de maior massa molecular o que reforça um efeito sinalizador de defesa visando o reforçamento da parede celular.

Os resultados demonstram que a via de ativação dos mecanismos de defesa da célula vegetal, induzida pelo **MeJA**, difere das vias ativadas pelo **AS** e **F-I**.

Os principais monossacarídeos neutros que constituem a parede celular de células em suspensão de *Rubus fruticosus* são as glucose (cerca de 55-61%), arabinose (cerca de 22-29%) e manose (cerca de 13,8-15%). Ocorrendo em menores concentrações os monossacarídeos de fucose (cerca de 0,65-1,2%), galactose (cerca de 0,5-0,8%), xilose (cerca de 0,5-0,8%) e ramnose (aproximadamente 0,5%).

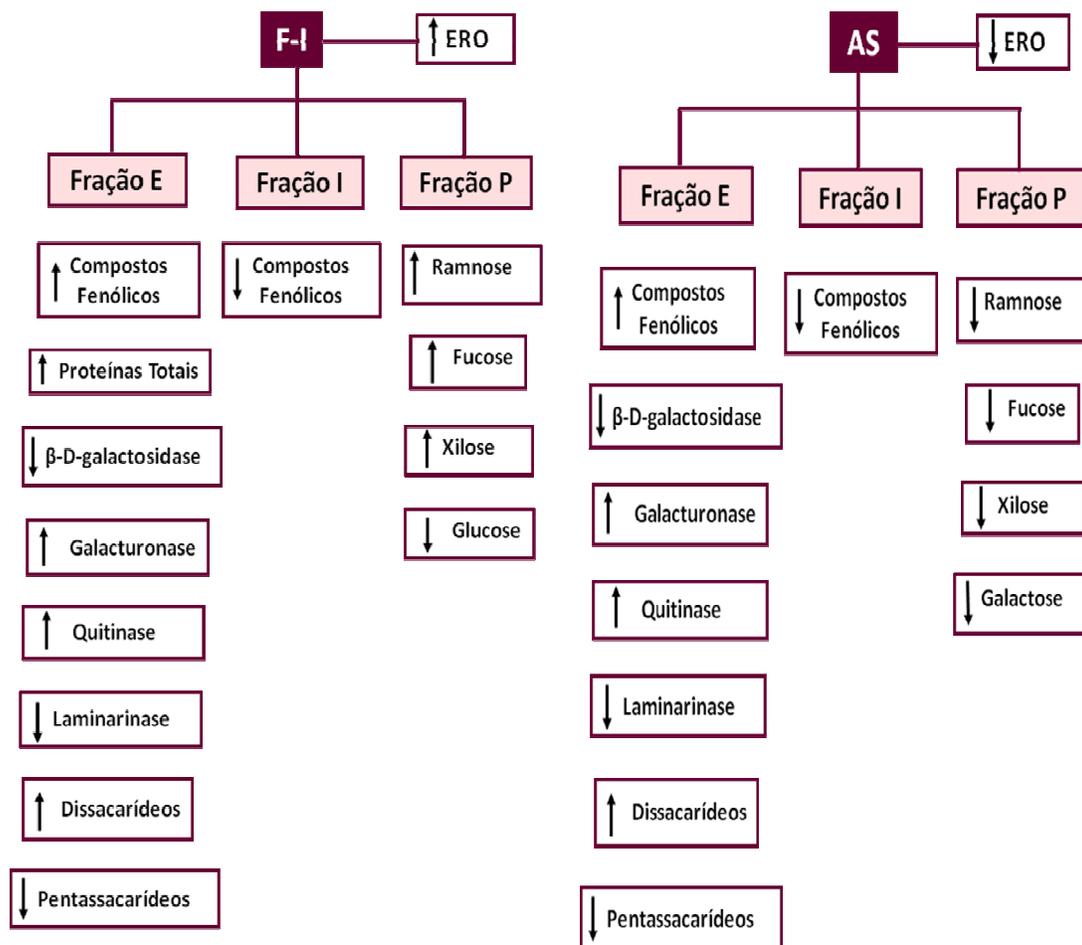


Figura 46. Resumo dos efeitos dos elicitores empregados em cultura de células de *Rubus fruticosus*. A) F-I e B) AS.

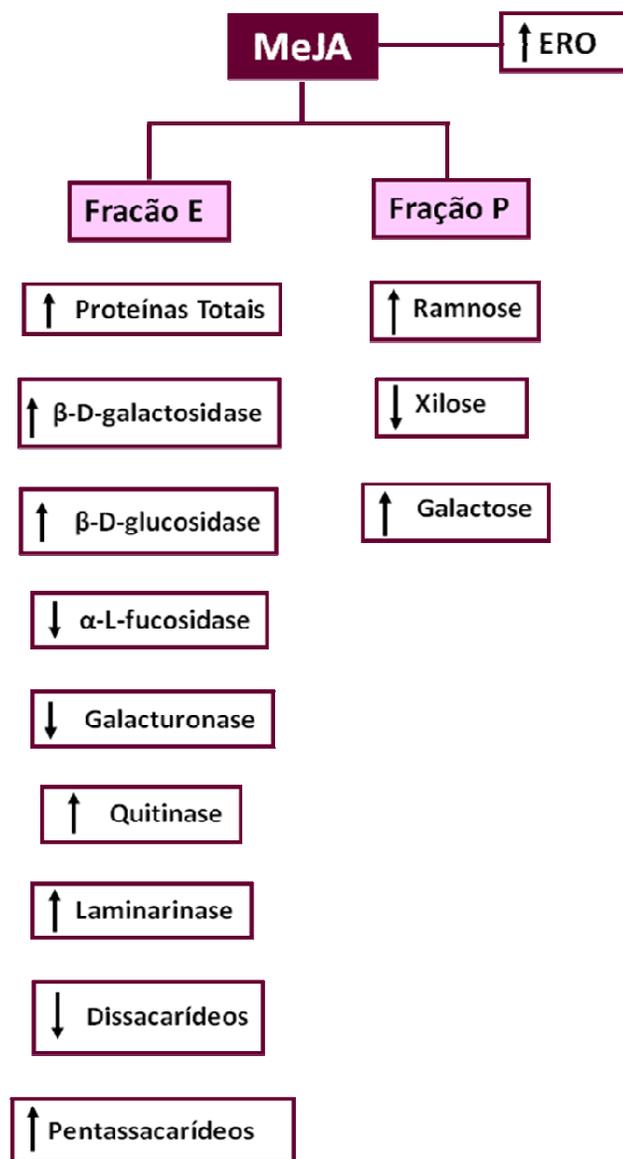


Figura 47. Resumo do efeito de MeJA empregado em cultura de células de *Rubus fruticosus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHUO, E. A.; AUDENAERT, K; MEZIANE, H.; HOFTE, M. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, v. 53, p. 65-72, 2004.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33. n. 1, p. 21-28, 1998.

ALLAN, A. C.; FLUR, R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cell. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 9, p. 119-1572, 1997.

ALVARES, M. E. Salicylic acid in the machinery sitive cell death and desiese resistance. **Plant Molecular Biology**, Netherlands v. 44, p. 429-442, 2000.

ANAND, A., RYU, C. M., UPPALAPATI, S. R., ALLEN, S., N., KANG, L., TANG, Y., AND MYSORE, K. S. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v. 146, p. 703-715, 2008.

ANAND, A., VAGHCHHIPAWALA, Z., RYU, C. M., KANG, L., WANG, K., DEL-POZO, O., MARTIN, G. B., AND MYSORE, K. S. Identification and characterization of genes involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation by virus-induced gene silencing. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 41-52, 2007.

ANDI, S.; TAGUCHI, F.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; ICHINOSE, Y. Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. **Plant Cell Physiology**, v. 42, n. 4, p. 446-449, 2001.

ANNIS, S. L. GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 1-14, 1997.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.

ANTUNES; L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilsterase em amora-preta (*Rubus* spp.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 63-66, 2006.

ARNOUS, A.; MEYER, A.S. Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3611-3619, 2009.

AUGUR, C.; BENHAMOU, N.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Purification, characterization, and cell wall localization of an α -fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. **Plant Journal**, v. 3, p. 415-426, 1993.

AYERS, A.R., EBEL, J.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. X. Fractions and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. sojae. **Plant Physiology**, v. 57, p. 760-765, 1976b.

AYERS, A.R., EBEL, J.; FINELLE, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assay of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. sojae. **Plant Physiology**, v. 57, p. 751- 759, 1976a.

AYERS, A. R.; VALENT, B.; EBEL, J.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. **Plant Physiology**, v. 57, p. 766-774, 1976c.

BAI, Z. H.; Zhang, H. X.; Qi, H. Y.; Peng, X. W.; Li, B. J. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, London, v. 95, p. 49-52, 2004.

BARNAVON, L.; DOCO, T.; TERRIER, N.; AGCORGES, A.; ROMICU, C.; PELLERIN, P. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 289-300, 2000.

BARRETO, A.L.H. **Estratégias de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc.; Magnus) Briosi ; Cav.] e *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz; Sacc.] em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta.** 297 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BARTLEY, I. M. β -galactosidase in ripening apples. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2107-2111, 1974.

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: Key to programmed cell death and periderm formation in with disease resistance and in general defense responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101-110, 2000.

BELESKI-CARNEIRO E.B.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; REICHER, F. Polysaccharides from *Chorisia speciosa*. St. Hil. **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**, New York, v. 14, 1996.

BELESKI-CARNEIRO, E. B.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Structural aspects of exudate from the fruit of *Chorisia speciosa*. St. Hil. **International Journal Biological Macromolecules**, Guildford, v. 26, p. 219- 224, 1999.

BELESKI-CARNEIRO, E.B.; SUGUI, J. A., REICHER, F. Structural and biological features of a hydrogel from seed coats of *Chorisia speciosa*. **Phytochemistry**, New York, v. 61, p. 157-163, 2002.

BERGEY, D.; OROSCO-CARDENAS, M.; MOURA, D. S.; RYAN, C. A. A wound and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. **Proceedings of National Academic Science**, Washington DC, v. 46, p. 1756-1760, 1999.

- BI, H. H.; ZENG, R. S.; SU, L. M.; AN, M.; LUO, S. M. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 5, p. 1089-1103, 2007.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutri**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BIGGS, K. J.; FRY, S. C. Solubilization of covalently bound extensin from Capsicum cell walls. **Plant Physiology**, v. 92, p. 197-204, 1990.
- BOLWELL, P. G. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. **Internation Review of Cytology**, New York, v. 146, p. 261-324, 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 73 p. Dissertação (mestrado em em Ciências na área de concentração de Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BRANDÃO, A. D.; DEL BEM, L. E.; VINCENTZ, M.; BUCKERIDGE, M. S. Expression pattern of four storage xyloglucan mobilization-related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. **Journal Experimental Botany**, v. 60, n. 4, p. 1191-1206, 2009.
- BRAVERMAN, J. B. S. **Introdução to the Biochemistry of foods**. Elsevier Publ. Amsterdam, 336 p., 1963.
- BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1st edition. Rockville, Maryland: ASP Press, 1367 pp., 2000.
- CAREY, A. T.; HOLT, K.; PICARD, S.; WILDE, R.; TUCKER, G. A.; BIRD, C.R.; SCHUCH, W.; SEYMOUR, G. B. Tomato exo-(1-4)- β -D-galactanase: isolation, changes during ripening of normal and mutant tomato fruit and characterization of a related cDNA clone. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1099-1107, 1995.
- CARLETI, R.; DE MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Jasmonato: Influência na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 183-186, 1999.
- CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000, p. 52-108.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1. p. 1-30, 1993.

CASSAB, G. I.; NIETO-SOTELO, J.; COOPER, J. B.; VAN HOLST, G. J.; VARNER, J. E. A developmentally regulated hydroxyproline rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. **Plant Physiology**, v. 77, p. 532-535, 1985.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e β -1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.

CHANDRU, H. K.; KIM, E.; KUK, Y.; CHOK; HAN, O. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stage. **Plant Science**, London, v. 164, p. 935-941, 2003.

CONTI, G. **Efeito da superexpressão do gene miox2 de Arabidopsis, na composição de carboidratos de parede celular secundária de plantas transgênicas de tabaco**. 105 p. Dissertação (mestrado em Ciências na área de concentração de Fisiologia e Bioquímica de Plantas)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

CUTT, J. R.; KLESSIG, D. F. Pathogenesis-related proteins. In: MEINS, F. JR.; BOLLER, T. (Eds). **Plant Gene Research**. New York, Springer-Verlag Wien, 1992, p. 181-216.

D'OVIDIO, R.; MATTEI, B.; ROBERTI, S.; BELLINCAMPI, D. Polygalacturonases, polygalacturonase - inhibiting proteins and pectic oligomers in plant - pathogen interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1696, p. 237-244, 2004.

DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 243-275, 1984.

DARVILL, A. G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, R. W.; CHEONG, J. J.; EBEHARD, S.; HAHN, M. G.; LÓ, V.M.; MARFÁ, V.; MEYER, B.; MOHNEN, D.; O'NEILL, M. A.; SPIRO, M. D.; VAN HALBEEK, H.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P. Oligosaccharins- oligosaccharides that regulate growth, development, and defense responses in plants. **Glycobiology**, v. 2, p. 181-198, 1992.

DE LA TORRE, F.; SAMPEDRO, J.; ZARRA, I.; REVILLA, G. *AtFXG1*, an Arabidopsis Gene Encoding α -L-Fucosidase Active against Fucosylated Xyloglucan Oligosaccharides. **Plant Physiology**, v. 128, p. 247-255, 2002.

DE LORENZO, G.; CASTORIA, R.; BELLINCAMPI, D.; CERVONE, F. Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: CARROLL, G. C.; TUDZYNSKI, P. **The Mycota: V. Plant Relationships**: Springer, Berlin, p. 61-83, 1997.

DE SOUZA, F. A. M. **Estudo do efeito de respostas hipersensibilidade sobre a parede celular em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. 145p. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Concentração: Fármacos e Medicamentos)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

DE SOUZA, W.R., 2005. **Estudo do Efeito Elicitor do Ácido Salicílico e do Polissacarídeo Extraído de Sementes de Paineira (*Chorisia speciosa*) em Cultura de Células de Amora-Preta (*Rubus fruticosus*)**. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica-Concentração: Fármacos e Medicamentos)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

DE VRIES, J. A., ROMBOUITS, F. M., VORAGEN, A.G. J.; PILNIK, W. Enzymic degradation of apple pectins, **Carbohydrate Polymers**, v. 2, p. 25, 1982.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmico**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEIGHTON, N.; BRENNAN, R.; FINN, C.; DAVIES, V.H. Antioxidant proprieties of domesticated and wild *Rubus* species. **Journal of Science of Food and Agriculture**. Chicago, v. 80, p. 1307-1313, 2000.

DELANEY, T. P.; UKNES, S.; VERNOOJJ, B.; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, D.; GAFFINE, T.; GUT-RELLA, M.; KESSMANN, H.; WARD, E.; RYALS, J. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, Washington DC, v. 266, p. 1247-1250, 1994.

DEVOTO, A.; TURNER, J. G. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. **Annals of Botany**, v. 92, p. 329-337, 2003.

DI SANTO, M. C.; PAGANO, E. A.; SOZZI, G. O. Differential expression of α -L-arabinofuranosidase and α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase genes during peach growth and ripening. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 562-569, 2009.

DINU, D. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letter**, EK, v. 6, n. 5, p. 397- 402, 2001.

DOARES, S. H.; SYROVETS, T.; WEILER, E. W.; RYAN, C. A. Oligogalacturonides and chitosan activate plants defensive genes through the octadecanoid pathway. **Proceeding of National Academic Science**, Washington DC, v. 93, p. 4095-4098, 1995.

DOKE, N.; MUIRA, Y. In vitro activation of NADPH- dependent O₂ generation system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 17-28, 1995.

DONNELLY, D. J.; DAUBENY, H. Tissue culture of *Rubus* species. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 183, p. 305-314, 1986.

DOPICO, B.; NICOLÁS, G.; LABRADOR, E. Partial purification of cell wall α -galactosidases and arabinosidases from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, p. 465- 468, 1989.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-85, 2002.

- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.
- EBEL, J.; SCHEEL, D. Signals in host-parasite interactions. In: CAROLL, G. C.; TUDZYNSKI, P. (Eds) *The Mycota. Plant Relationships*. Part A. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1997, p. 85-105.
- EKMEKCI, Y.; TERZIOGLUS, S. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 83, p. 69-81, 2005.
- ENGLEHARDT, J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. **Carbohydrates Europea**, Amsterdam, v. 12, p. 5-14, 1995.
- ERIKSSON, K.-E.; PETTERSSON, B.; WESTERMARK, U. Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. **FEMS Letter**, v. 49, p. 282-285, 1974.
- FACCHINI, P. J.; JOHNSON, A. G.; POUPART, J.; DELUCA, V. Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 687-697, 1996.
- FARKAS, V.; HANNA, R.; MACLACHLAN, G. Xyloglucan oligosaccharide α -L-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3203-3207, 1991.
- FARMER, E. E.; ALMÉRAS, E.; KRISHNAMURTHY, V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 372-378, 2003.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound – inducible proteinase inhibitor. **The Plant Cell**, v. 4, p. 129-134, 1992.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood. Chemistry: Ultrastructure: Reactions**. Berlin. Walter de Gruyter, 1989.
- FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.
- FINNE, A. Micropropagation of *Rubus* spp. **Journal of Agricultural Science of Finland**, [S.l.], v. 58, p. 193-196, 1986.
- FISHER, K.; ARONSON, N. J. R. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding rat liver α -L-fucosidase. **Biochemical Journal**, v. 15, p. 695- 701, 1989.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.
- FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phytopathology**, v.45, p. 680-685, 1955.
- FORCAT, S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W.; GRANT, M. R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in

- plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4, n.16, doi: 10.1186/ 1746-4811, 2008.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, London, v. 119, p. 355-364, 2003.
- FREY, M.; CHOMET, P.; GLAWISCHNIG, E.; GLAWISCHNIG, E.; STETTNER, C.; GRÜN, S.; WINKLMAIR, A.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; MEELEY, R. B.; BRIGGS, S. P.; SIMCOX, K.; GIERL, A. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. **Science**, v. 277, p. 696-699, 1997.
- FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of the wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, London, v. 161, p. 641- 675, 2004.
- FRY, S. C. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 497-520, 1995.
- FRY, S. C. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. London: Longman **Scientific and Technical**, 246 p., 1988.
- FRY, S. C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 211, p. 1-11, 1989.
- FRY, S. C.; ALDINGTON, S. P.; HETHERINGTON, P.R.; AITKEN, J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1- 5, 1993.
- FUKUSHIMA, H.; DEWET, J.; O'BRIEN, J. Molecular cloning of a cDNA for human alpha-L-fucosidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, p. 1262-1265, 1985.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGMTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v. 261, p. 754-756, 1993.
- GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, 1994.
- GAVA, A. J. Princípios de tecnologia de alimentos. 1 ed. São Paulo: Nobel, 104 p., 1998.
- GERSHENZON, J. Secondary metabolites and plant defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds). **Plant Physiology**. 3rd edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Chapter 13, p. 283-308, 2002.
- GIEHL, K. Oncogenic *Ras* in tumour progression and metastasis. **Biology Chemistry**, v. 386, p. 193-205, 2005.
- GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, p. 109-113, 2001.

- GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends Plant Sciences**, Kidlington, v. 7, p. 251-256, 2002.
- GOODMAN, R. N.; NOVACKY, A. J. The hypersensitive reaction in plants to pathogens a resistance phenomenon. **St. Paul**, Minnesota. APS Press. 1994.
- GOZZO, F. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 4487-4503, 2003.
- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion Plant Biology**, v. 9, p. 414-420, 2006.
- GROSS, K. C.; SAMS, C. E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2457-2461, 1984.
- HAMANN, T.; BENNETT, M.; MANSFIELD, J.; SOMERVILLE, C. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. **Plant Journal**, v. 57, p. 1015- 1026, 2009.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. F. G. Response to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1st edition. Rockville, Maryland. ASP Press. Chapter 21, 2000, p. 1102-1152.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 177- 193, 2003.
- HARLEY, S. M.; BEEVERS, H. Characterization and partial purification of three glycosidases from castor bean endosperm. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1459- 1464, 1985.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase end endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, p. 313-318, 1993.
- HARMS, K.; RAMIREZ, I.; PEÑA-CORTÉS, H. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. **Plant Physiology**, v.118, p. 1057-1065, 1998.
- HASE, S.; TAKAHASHI, S.; NAKAHO, K.; ARIE, T.; SEO, S.; OHASHI, Y.; TAKENAKA, S.; TAKAHASHI, H. Jasmonic acid signaling is required for bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. **Plant Pathology**, v. 57, n. 5, p. 870-876, 2008.
- HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 403-407, 1999.
- HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139-168, 1989.

- HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, n.4, p.315-319, 2000.
- HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4107–4112, 1998.
- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Annuaire des Sciences Naturelles et Biologie Végétale**, Paris, v. 14, p.1-233, 1953.
- HERMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.
- HONNER, J. D. Astringency of Douglas-fir foliage in relation to phenology and xylem pressure potential. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 4, p. 1227-1237, 1988.
- HOWE, G. A.; LEE, G. I.; ITOH, A.; LI, L.; De ROCHER, A. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato: Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. **Plant Physiology**, v. 123, p. 711-724, 2000.
- HOWE, G. A.; LIGHTNER, J.; BROWSE, J.; RYAN, C. A. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **The Plant Cell**, v. 8, p. 2067-2077, 1996.
- HRAZDINA, G. Compartmentation in phenolic metabolism. **Acta Horticulture**, v. 1, n. 381, p. 8693, 1994.
- HUDGINS, J. W.; FRANCESCHI, V. R. Methyl Jasmonate-Induced Ethylene Production Is Responsible for Conifer Phloem Defense Responses and Reprogramming of Stem Cambial Zone for Traumatic Resin Duct Formation. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2134-2149, 2004.
- HUSTACHE, G., MOLLARD, A.; BARNOUD, F. Culture illimitée d'une souche anergisée de *Rosa glauca* par la technique des suspensions cellulaires. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 281: p. 1381-1384, 1975.
- IGARASHI, K.; TAMI, T.; KAWAI, R.; SAMEJIMA, M. Family 3 beta-glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3-beta-glucosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 572-576, 2003.
- ISAAC, S. **Fungal life-style**. In CHAPMAN & HALL (Eds). Fungal-Plant interactions, London, 418 p., 1992.
- JARVIS, A. C.; McCANN, M. C. Macromolecular Biophysics of plant cell wall: concepts and methodology. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 38, p. 1-13, 2000.
- JENNINGS, D. L.; McNICOL, R. J. *Rubus* breeding: recent progress and problems. **Plant Breeding Abstracts**, Farnham Royal, v. 61, p. 753-758, 1991.
- JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 225-231, 2004.

JUNQUEIRA, A. C. B. **Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho.** 75 p. Dissertação (mestrado em Agronomia na área de concentração de Fitopatologia)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

KAIDA, R.; SATOH, Y.; BULONE, V.; YAMAD, Y.; KAKU, T.; HAYASHI, T.; KANEKO, T. S. Activation of β -glucan synthases by wall-bound purple acid phosphatase in tobacco cells. **Plant Physiology**, 2009.

KANAI, R. ; EDWARDS, G. E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and Crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiology**, Lancaster, v.52, p. 484-490, 1973.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases: regulation and function. **Cell and Molecular Biology**, v. 8, p. 809-824, 2003.

KAWAMURA, Y.; TAKENAKA, S.; HASE, S.; KUBOTA, M.; ICHINOSE, Y.; KANAYAMA, Y.; NAKAHO, K.; KLESSIG, D.F.; TAKAHASHI, H. Enhanced defense responses in arabidopsis induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. **Plant Cell Physiology**. v. 50, n. 5, p. 924-934, 2009.

KAWASAKI, S. Extensin secreted into the culture medium of tobacco cells. 11. Extensin subfamilies of similar composition. **Plant Cell Physiology**, v. 32, p. 721-728, 1991.

KAYSHAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KEEGSTRA, K., TALMADGE, K. W., BAUER, W. D., ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 51, p. 188-197, 1973.

KELLER, B.; TEMPLETON, M. D.; LAMB, C. J. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 86, p. 1529-1533, 1989b.

KIDBY, D. K.; DAVIDSON, D. J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 55, n. 1, p. 321-325, 1973.

KLARZYNSKI, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J. M.; YVIN, J. C.; KOPP, M.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Linear β -1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1027-1038, 2000.

KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOY, K. Characteristics of β - galactosidase purified from cell suspension cultures of carrot. **Physiology Plant**, v. 68, p. 46-52, 1986.

KOTCHONI, S. O.; GACHOMO, E. W. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 3, p. 389-404, 2006.

KUMAR, D.; KLESSIG D. F. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. **Proceeding of National Academic Science**, USA v. 100, p. 16101-6106, 2003.

- LAMB, C. E.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, n. 2, p. 251-275, 1997.
- LANG, C.; DORNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 2, p. 366-375, 2000.
- LEACH, J. E.; CANTRELL, M. A.; SEQUEIRA, L. A hydroxyproline rich bacterial agglutinin from potato: extraction, purification, and characterization. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1353-1358, 1982.
- LEE Y. E., ZEIKUS J. G. Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p.1235-1243, 1993.
- LEE, H. I.; LÉON, J.; RASKIN, I. Biosyntheses and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United State or America**, Washington DC, v. 92, p. 4072-4079, 1995.
- LEE, S.; CHOI, H.; SUH, S.; DOO, I.; OH, K.; CHOI, E. J.; TAYLOR, A. N. S.; LOW, P. S.; LEE, Y. Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, v. 121, n. 1, p. 147-152, 1999.
- LÉONARD, R.; PABST, M.; BONDILI, J.S.; CHAMBAT, G.; VEIT, C.; STRASSER, R.; ALTMANN, F. Identification of an Arabidopsis gene encoding a GH95 alpha1,2-fucosidase active on xyloglucan oligo- and polysaccharides. **Phytochemistry**, v. 69, Issue 10, p. 1983-1988, 2008.
- LEONTIEV-ORLOV, O. Propagation of plant of *Rubus* generation by the method of cutting. **Proceedings of Problems of Modern Horticulture**, California, p. 37, 1989.
- LIMA, D. U; OLIVEIRA, R. C.; BUCKERIDGE, M. S. Seed storage hemicellulose at wetend additives in papermaking. **Carbohydrate Polymers**. London, v. 52, p. 367-373, 2002.
- LIMBERG, G.; KÖRNER, R.; BUCHHOLT, H. C.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, p. 321-332, 2000b.
- LUCAS, A. J. **Plant pathology and plant pathogens**, 3rd Ed., Blackwell Science Ltd., London, p. 274, 1998.
- LUZZATTO, T.; GOLAN, A.; YISHAY, M.; BILKIS, J.; BEN-ARI, J.; YEDIDA, I. Priming of antimicrobial phenolics during induced resistance response towards *Pectobacterium carotovorum* in the ornamental monocot calla lily. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chur, v. 55, n. 25, p. 10315-10322, 2007.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACE, M. E. Histochemical localization of phenols in health and. diseased banana roots. **Physiologia Plantarum**, v. 16, p. 915-925, 1963.

MAIORANO, A. E. **Produção de pectinase por fermentação em estado sólido**. São Paulo, 1990. 262 p. Tese (Doutor em Engenharia Química), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (USP).

MASON, H. S.; MULLET, J. E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wound, and jasmonic acid. **The Plant Cell**, v. 2, p. 569-579, 1990.

MATHIEU, Y.; KURKDJIAN, A.; XIA, H.; GUERN, J.; KOLLER, A.; SPIRO, M. D.; O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. **The Plant Journal**, Oxford, v.1, p. 333-343, 1991.

MAXWELL, D. P.; WANG, Y., MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of National Academy of Sciences**, USA, v. 96, p. 8271-8276, 1999.

MAXWELL, D. P.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. **Plant Journal**, v. 29, p. 269-279, 2002.

McCANN M. C.; WELLS, B.; ROBERTS, K. Direct visualization of cross-links in the primary cell wall. **Journal of Cell Science**, v. 96, p. 323-334, 1990.

McCANN, M. C; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: LLOYD, C.W. (ed) **The cytoskeletal basis of plant growth and form**, Academic Press, London, p. 109-129, 1991.

McCREADY, R.M. Pectin. In: JOSELYN, M. A. **Methods in Food Analysis**. Academic Press, 2nd edition, cap. XIX, p. 565-599, 1970.

McDOUGALL, G.; FRY, S. C. Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. **Planta**, v. 175, p. 412- 416, 1988.

McDOUGALL, G.; FRY, S. C. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1042-1048, 1990.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell wall of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MEEUSE, B. J. D. Thermogenic respiration in aroids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 117-126, 1975.

MELLON, J. E.; HELGESON, J. P. Interaction of a hydroxyproline rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens. **Plant Physiology**, v. 70, p. 401-405, 1982.

MÉNARD, R.; RUFFRAY, P.; FRITIG, B.; JEAN-CLAUDE YVIN, J. C.; KAUFFMANN, S. Defense and Resistance-inducing Activities in Tobacco of the Sulfated β -1,3 glucan PS3

and its Synergistic Activities with the Unsulfated Molecule. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 12, p. 1964-1972, 2005.

MILBURY, P. E.; GRAF, B.; CURRAN-CELENTANO, J. M.; BLUMBERG J. B. Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 48, n. 5, p. 2343-2349, 2007.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOORE, P. J.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P.; STAEHELIN, A. L. Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 82, p. 787-794, 1986.

MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1381-1387, 2000.

MURATA, Y.; PEI, Z. M.; MORI, I. C.; SCHROEDER, J. I. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. **Plant Cell**, v. 13, p. 2513- 2523, 2001.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. **Journal Experimental Botany**. Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NISHITANI, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. **International Journal of Cytology**. v. 173, p. 157-206, 1997.

NISHITANI, K.; TOMONAGA, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of xyloglycan molecule to another xyloglucan molecule. **Journal of Biology Chemistry**, v. 267, n. 29, p. 21058-21064, 1992.

NITA-LAZAR, M.; CHEVOLOT, L.; IWAHARA, S.; TAKEGAWA, K.; FURMANEK, A.; LIÉNART, Y. High performance liquid chromatography and photodiode array detection of ferulic acid in *Rubus* protoplasts elicited by O-glycans from *Fusarium* sp. M7-1. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 1019-1027, 2002.

NITA-LAZAR, M.; HEYRAUD, A.; GEY, C.; BRACCINI, I.; LIENART, Y. Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 51, p. 625-634, 2004.

NOJOSA, G. B. A., RESENDE, M. L. V., AGUILAR, M. A. G., BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 148-154, 2003.

NORONHA, E. R.; ULHOA, C. Characterization of a 29-KDa beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 119-123, 2000.

- NUNAN, K. J.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P.; FINCHER, G. B. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape Berry development. **Planta**, Berlin, v. 214, n. 2, p. 253-264, 2001.
- NURNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 372-379, 2001.
- O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: ROSE, J.K.C. (Eds). The Plant cell wall. **Annual Plant Review**. CRC Press, v. 8, p. 1-54, 2003.
- OCCHIODORO, T.; BECKMANN, K.; MORRIS, C. P.; HOPWOOD, J. Human α -L-fucosidase: complete coding sequence from cDNA clones. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 164, p. 439- 445, 1989.
- OIKAWA, A.; ISHIHARA, A.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O.; IWAMURA, H. Induced accumulation of HDMBOA-Glc in maize leaves. **Phytochemistry**, v. 56, p. 669-675, 2001.
- O'NEILL, M. A., ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A., 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY & HARBORNE (Eds). **Methods in Plant Biochemistry**, Academic Press, London, v. 2, p. 415-441, 1990.
- ORDOG, S. H.; HIGGINS, V. J.; VANLERBERGHE, G. C. Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1858-1865, 2002.
- OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Cell**, v. 13, n. 1, p. 179-192, 2001.
- OWEN, K. J.; GREEN, C. D.; DEVERALL, B. J. Systemic acquired resistance against root-knot nematodes in grapevines. In: International congress of plant pathology, Chapter 7, Edinburg, UK. **Proceedings Edinburg**: [s.n.], 1998.
- PARK, S. W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, p. 113-116, 2007.
- PARKER, D.; BECKMANN, M.; ZUBAIR, H.; ENOT, D.P.; CARACUEL-RIOS, Z.; OVERY, D.P.; SNOWDON, S.; TALBOT, N.J.; DRAPER, J. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of 3 host plant species by *Magnaporthe oryzae*. **The Plant Journal**, 2009.
- PARKER, J. E. Plant recognition of microbial patterns. **Trends Plant Sciences**, Kidlington, v. 8, p. 245-247, 2003.
- PARTHIER, B. Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence. **Journal Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 9, p. 1-7, 1990.

- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia, v.1- Princípios e conceitos**. 3a ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, Chapter 22, p. 417-452.
- PATIER, P.; POTIN, P.; ROCHAS, C.; KLOAREG, B.; YVIN, J. C.; LIENART, Y. Free or silica bound oligokappa-carragenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. **Plant Science**, Shanon-Ireland, v. 10, p. 27-35, 1995.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 10, p. 1571-1580, 1998.
- PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estádios de aturação. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.4, p.1079-1083, 2000.
- POTTER, I.; FRY, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes effects of applied gibberellic acid. **Plant Physiology**, v. 103, p. 235-241, 1993.
- PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal Biotechnology**, v. 137, p. 34-43, 2008.
- RAO, M. V.; LEE, H.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.; DAVIS, K. R. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. **Plant Cell**, Oxford, v. 12, p. 1633-1646, 2000.
- RASKIN, I.; EHMANN, A.; MELANDER, W. R.; MEEUSE, B. J. D. Salicylic Acid: A Natural Inducer of Heat Production in *Arum Lilies*. **Science**, v. 237, n. 4822, p. 1601-1602, 1987.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
- REITER, W. D.; CHAPPLE, C. C. S.; SOMERVILLE, C. R. Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. **Science**, v. 261, p. 1032-1035, 1993.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacueiros contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotriazolone (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.
- REYMOND, P.; GRUNBERGER, S.; PAUL, K.; MULLER, M.; FARMER, E. E. Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane in vitro. **Proceedings of National Academic Science**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4145-4149, 1995.
- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

- ROCHA, M. R.; CASTRO, R. M.; PINA, R. C.; MARTINI, A. L. Efeito do Acibenzolar-S-Methyl (Benzothiadiazole), como indutor de Resistência Sistêmica em soja (*Glycine max* cv.), sobre *Heterodera glycines*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n. 2, p. 35-38, 2000.
- ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue and Cell**, Siena, v. 24, n. 3, p. 335-345, 1992.
- ROSE, J. K.; BENNETT, A. B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 176-183, 1999.
- ROSE, J. K. C., BRAAM, J., FRY, S. C.; NISHITANI, K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 1421-1435, 2002.
- RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. I.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1809-1819, 1996.
- SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Technical Association for the Worldwide Pulp, Paper, and Converting Industry (TAPPI)**, v. 37, n. 8, p. 336-343, 1954.
- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.
- SALGADO, P.R. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fases de frutificação e do clima**. 60p. Dissertação (mestrado em agronomia na área de concentração de Fitotecnia)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, 1998.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.
- SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J. P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S. C.; MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 97, p. 11655-11660, 2000.
- SCHINEIDER, M.; SHWEIZER, P.; MEUWLY, P. MÉTRAX, J. P. Systemic acquired resistance in plants. **International Journal of Cytology**, New York, v. 168, p. 3003-304, 1996.
- SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

- SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions the jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology*. **Plant Molecular Biology**, Rockville, v. 44, p. 569-589, 1993.
- SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defence. **Current Opinion Plant Biology**, v. 6, p. 365-371, 2003.
- SHARMA, S.; SANDHU, D. K.; BRAGGA, P. S. Physical characterization of isozymes of endo- β -1,4-glucanase and β -1,4-glucosidase from *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology Letter**, v. 79, p. 99-104, 1991.
- SHAW, S.; LONG, S. Nod factor inhibits reactive oxygen efflux in a host legume. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, p. 2196-2204, 2003.
- SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. In: CALLOW, J. (Ed.) **Advances in Botanical Research**, London: Academic Press, v. 26, p. 135-192, 1997.
- SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 223-233, 2001.
- SHIEH, M. T.; BROWN, R. L.; WHITEHEAD, M. P.; CARY, J. W.; COTTY, P. J.; CLEVELAND, T. E.; DEAN, R. A. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3548-52, 1997.
- SHIMONI, M.; BAR-ZUR, A.; REUVENI, R. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Journal Phytopathology**, v. 131, p. 315-321, 1991.
- SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, v. 385, 718-721, 1997.
- SILIPO, A.; MOLINARO, A.; STURIALE, L. DOW, J. W.; ERBS, G.; LANZETTA, R.; NEWMAN, M. A.; PARRILLI, M. The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Biology and Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 39, p. 33660-33668, 2005.
- SILVA, C. A.; BRAGA, M. R. Release and activity of phytoalexin-inducing oligosaccharides in tropical Rubiaceae: influence of pectin methylesterification. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2004.
- SINGH, S.; BRAR, K.; SANDHU, D. K.; KAUR, A. Isozyme polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, p. 289-296, 1996.
- SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry Fundamentals and applications, 2nd. New York. **Academic Press**, p. 223, 1981.
- SLESÁK, E.; SLESÁK, M.; GABRYŠ, B. Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry–oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) probing behavior. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 12, p. 2529-2543, 2001.

- SLESAK, I.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKA, B.; NIEWIADOMSKA, E.; RATAJCZAK, R.; KARPINSKI, S. Redox control of oxidative stress responses in the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v. 40, n. 6, p. 669-677, 2002.
- SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.
- SMITH, J. J.; MULDOON, E. P.; LAMPORT, D. T. A. Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1233-1239, 1984.
- SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 12, 2007.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista Nutrição**, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.
- SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 22, p. 53-78, 2006.
- SOUZA-LIMA, A. R. **Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases**. 85 p. Dissertação (mestrado em Biotecnologia: área de concentração Agro-Florestal)- Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2006.
- STACEY, G.; MCALVIN, C. B.; KIM, S. Y.; OLIVARES, J.; SOTO, M. J. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1473-1481, 2006.
- STAFSTROM, J. P.; STAEHELIN, L. A. Cross-linking patterns in salt-extractable extensin from carrot cell walls. **Plant Physiology**, v. 81, n. 1, p. 234-241, 1986.
- STASWICK, P. E.; HUANG, J. F.; RHEE, Y. Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p.1 30-136, 1991.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review Phytopatology**, Palo Alto-CA, v. 35, p. 235-270, 1997.
- STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, p. 687-706, 1993.
- STRAWN, M. A.; MARR, S. K.; INOUE, K.; INADA, N.; ZUBLETA, C.; WILDERMUTH, M. C. *Arabidopsis isochorismate* synthase functional in pathogeninduced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 5919-5933, 2007.

- STUART, D. A.; VARNER, J. E. Purification and characterization of a salt-extractable hydroxyproline rich glycoprotein from aerated carrot discs. **Plant Physiology**, v. 66, p. 787-792, 1980.
- SUDHAKAR, N.; NAGENDRA-PRASAD, D.; MOHAN, N.; MURUGESAN, K. Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against Cucumber mosaic virus by using ozone. **Journal of Virological Methods**, v. 139, p. 71-77, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, Chapter 15, p. 339-364, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer, 2002. 690 p.
- TAKENAKA, S.; NAKAMURA, Y.; KONO, T.; SEKIGUCHI, H.; MASUNAKA, A.; TAKAHASHI, H. Novel elicitor-like proteins isolated from cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 5, p. 325-339, 2006.
- TEN HAVE, A.; MULDER, W.; VISSER, J.; VAN KAN, J.A. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 11, p. 1009-1016, 1998.
- TOMŠOVSKÝ, M.; POPELÁŘOVÁ, P.; BALDRIAN, P. Production and Regulation of Lignocellulose-Degrading Enzymes of *Poria*-Like Wood-Inhabiting Basidiomycetes. **Folia Microbiology: International journal for general, environmental and applied microbiology and immunology**, v. 54, n. 1, p. 74-80, 2009.
- TRUMAN, W.; BENNETT, M. H.; KUBIGSTELTIG, I.; TURNBULL, C.; GRANT, M. *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** v. 104, p. 1075-1080, 2007.
- UEDA, J.; KATO, J. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 246-249, 1980.
- UMEMURA, K.; OGAWA, N.; KOGA, J.; IWATA, M.; USAMI, H. Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 43, n. 7, p. 778-784, 2002.
- VAN HOLST, G. J.; VARNER, J. E. Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline rich cell wall glycoprotein from carrot root. **Plant Physiology**, v. 74, p. 247-251, 1984.
- VAN LOON, L. C.; VAN KAMMENEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN" changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v. 40, n. 2, p. 199-211, 1970.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analyses of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

- VANLERBERGHE, C. G.; ROBSON, C. A. Transgenic Plant Cells Lacking Mitochondrial Alternative Oxidase Have Increased Susceptibility to Mitochondria-Dependent and -Independent Pathways of Programmed Cell Death. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1908-1920, 2002.
- VANLERBERGHE, G. C.; VANLERBERGHE, A. E.; MCINTOSH, L. Molecular genetic alteration of plant respiration (silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco). **Plant Physiology**, v. 106, p. 1503-1510, 1994.
- VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIENART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1013-1021, 1998.
- VERBERNE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 779-783, 2000.
- VILARIÑO, C.; DEL GIORGIO, J. F.; HOURS, R. A.; CASCONI, O. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 26, n. 2, p. 107-110, 1993.
- VORWERK, S.; SOMERVILLE, S. C.; SOMERVILLE, C. R. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 4, p. 203-209, 2004.
- VRANOVÁ, E.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1227-1236, 2002.
- WAGNER, A. M.; WAGNER, M. J. Changes in mitochondrial respiratory chain components of petunia cells during culture in the presence of antimycin A. **Plant Physiology**, v. 115, p. 617-622, 1997.
- WALKER-SIMMONS, M.; HADWIGER, L.; RYAN, C. A. Chitosan and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 110, n. 1, p. 194-199, 1983.
- WANG, S. Y.; MAAS, J. L.; PAYNE, J. A.; Galletta, G. J. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. **Journal small fruit and viticulture**, v. 2, n. 4, p. 11-49, 1994.
- WANG, J. W.; XU, T.; ZHANG, L. W.; ZHONG, Z. M.; LUO, S. M. Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid and phenolic acid content in maize and its allelopathic activity to *Echinochloa crusgalli* (L.). **Allelopathy Journal**, v. 19, p. 161-169, 2007.
- WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. D.; WIEDERHOD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.
- WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 217-224, 2002.

WHITAKER, J. R. Pectic enzymes. **Principles of Enzimology for the Food Sciences**, 2nd edition, New York, p. 425-436, 1994.

WHITNEY, S. E. C.; BRIGHAM, J. E.; DARKE, A. H.; GRAND-REID, J. S.; GIDLEY, M. J. In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastrutural and molecular aspects. **The Plant Jornal**, Oxford, v. 8, p. 491-504, 1995.

WHITNEY, S. E. C.; GOTHARD, M. G. E.; MITCHELL, J. T.; GIDLEY, M. J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, p. 657-663, 1999.

WILDERMUTH, M. C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, London, v. 414, p. 562-565, 2001.

WILLATS, W. G. T.; MCCARTNEY, L.; KNOX, J. P. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 213, p. 37-44, 2001.

WILSON, R. H.; SMITH, A. C.; KACURAKOVA, M.; SAUNDERS, P. K.; WELLNWE, N.; WALDRON, K. W. The mechanical properties and molecular dybamica of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 124, p. 397- 405, 2000.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation methods **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

XIE, Z.; CHEN, Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. **Plant Physiology**, v. 120, p. 217-225, 1999.

XU, W.; PURUGGANAN, M. M.; POLISENSKY, D. H.; ANTOSIEWICZ, D. M.; FRY, S. C.; BRAAM, J. *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1555-1567, 1995.

YAMAMIZO, C.; KUCHIMURA, K.; KOBAYASHI, A.; KATOU, S.; KAWAKITA, K.; JONES, J. D. G.; DOKE, N.; YOSHIOKA, H. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feed-back confers potato blight resistance. **Plant Physiology**, v. 140, p. 681-692, 2006.

YORK, W. S.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. **Plant Physiology**, v. 75, p. 295- 297, 1984.

ZEIER, J.; GOLL, A.; YOKOYAMA, M.; KARAHARA, I.; SCHREIBER, L. Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. **Plant Cell and Environment**, v. 22, p. 271-279, 1999.