



GRAU DE METIL ESTERIFICAÇÃO DE PECTINAS EM RAÍZES DE Videira POR ANTICORPO JIM7 COMO INDICADOR DE TOLERÂNCIA À Pérola-da-Terra

MARCELO ZART¹; ALEXANDRA ANTUNES MASTROBERTI²; HENRIQUE PESSOA DOS SANTOS³; JORGE ERNESTO DE ARAUJO MARIATH²; PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA⁴

INTRODUÇÃO

Entre as principais pragas da viticultura brasileira, destaca-se a cochonilha pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis*, que tem hábito subterrâneo, se alimentando nas raízes das plantas e, por isso, está relacionada com o declínio e a morte de videiras (BOTTON; COLLETA, 2010). Até o momento não existe um método eficiente de controle para o manejo desta praga nos vinhedos, mas há evidências de tolerância da espécie *Vitis rotundifolia* em relação ao ataque de pérola-da-terra (BOTTON; COLLETA, 2010). Contudo, ainda não se dispõe de informações científicas sobre as estratégias de resistência e/ou tolerância da espécie *V. rotundifolia* em relação ao ataque da pérola-da-terra.

Entre os diferentes tipos de enzimas já estudadas em insetos sugadores, destaca-se o grupo das pectinases, que atuam diretamente nos componentes pécnicos da parede celular vegetal (MA et al., 1990). De maneira geral, a parede primária das células vegetais é rica em pectinas, as quais são polímeros complexos que apresentam diferentes graus de metilesterificação (WILLATS et al., 2001). O grau de metilesterificação tem influência sobre as propriedades gelificantes das pectinas e a ação de pectinases, alterando, conseqüentemente, a rigidez e a resistência das paredes celulares (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi utilizar um anticorpo monoclonal específico para pectinas de alta metilesterificação, visando relacionar a presença desse epitopo e sua distribuição nas paredes celulares do parênquima cortical de raízes com o contraste de tolerância ao ataque de pérola-da-terra de diferentes genótipos de videira (*Vitis* sp.).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em abril de 2012 no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica/UFRGS. As plantas utilizadas foram multiplicadas na Embrapa Uva e Vinho, sendo representadas pelas cultivares: 'Paulsen 1103' (*V. berlandieri* X *V. rupestris*); 'Isabel'

¹ Eng. Agr., estudante de pós-graduação, Fitotecnia-UFRGS-RS, e-mail: marcelo_zart@yahoo.com.br

² Biólogo^(a), Prof^(a), Botânica-UFRGS, e-mail: a_mastroberti@yahoo.com, jorge.mariath@ufrgs.br

³ Eng. Agr., Pesquisador Embrapa Uva e Vinho -RS, e-mail: henrique@cnpuv.embrapa.br

⁴ Eng. Agr., Prof. Associado, Dep. Hortic. e Silvíc., Fac. Agronomia, UFRGS, PPGFitotecnia-UFRGS, e-mail: pvd Souza@ufrgs.br, bolsista CNPq

(*V. labrusca*); ‘Magnólia’ (*V. rotundifolia*); e a seleção do programa de melhoramento da Embrapa Uva e Vinho, nomeada provisoriamente de 548-15 (híbrido *V. labrusca* X *V. rotundifolia*). Porções de raízes em estágio de crescimento secundário foram removidas das plantas e seccionadas transversalmente com espessura aproximada de 10 µm, em micrótomo de Ranvier, sendo os cortes mergulhados em água destilada para evitar a desidratação dos tecidos. Em seguida os cortes foram colocados em microtubos (0,5 ml) com solução PBS (formaldeído 4% em tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,2) por 2 h. Em seguida, os cortes foram submetidos por uma hora à uma solução de 3% de proteína de leite desnatado em PBS, lavados por um minuto com PBS e incubados por 12 h (durante a noite) com o anticorpo primário JIM7, diluído 10 vezes em PBS, o qual detecta um epitopo de hamogalacturonanos (HG) com metil-esterificação acima de 80% (KNOX et al., 1990). Após a incubação, os cortes foram lavados novamente em PBS por quatro vezes de 1 min cada, e incubados em anticorpo secundário Goat anti-rat FITC (Sigma), diluído 100 vezes em PBS, mantido no escuro, por 1 h e 30 min. Após esse procedimento os cortes foram novamente lavados em PBS por seis vezes por 1 min cada, para montagem em lâmina e lamínula, utilizando-se um meio de parafenilediamina em glicerol tamponado, como *antifade*.

As lâminas foram analisadas por epifluorescência em microscópio Leica DMR HC com filtro de excitação de 450-490 nm. As imagens foram capturadas em câmera digital Leica DC500 e analisadas por comparação quanto à reação de fluorescência observada nas paredes das células das diferentes cultivares. Em todos os genótipos foi realizado um ensaio controle, com somente anticorpo secundário, para evitar erros de observação nos ensaios testes com anticorpos primário e secundário, devido à existência de auto fluorescência em alguns tecidos vegetais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise comparada entre os cortes do ensaio controle com o ensaio teste, foi possível observar a eficiência de marcação nas paredes celulares dos tecidos de raiz em todos os genótipos. A evidência da presença de epitopos pécticos no parênquima cortical das seções marcadas pelo JIM7 e FITC (de excitação verde) não foi observada nas seções-controle, ou seja, quando omitido o anticorpo primário JIM7. A comparação entre as imagens obtidas pelo processo de marcação por imunofluorescência nas paredes das células mostrou distinção entre os diferentes genótipos. Uma maior marcação foi observada nos cortes da cultivar ‘Paulsen 1103’ (Figura 1a), quando comparado com a seleção ‘548-15’ (Figura 1b) e ‘Isabel’ (Figura 1c), as quais apresentaram uma marcação intermediária, e ‘Magnólia’ (Figura 1d) que apresentou uma marcação tênue. Portanto, com essa análise foi possível obter uma distinção clara entre os genótipos, principalmente entre ‘Paulsen 1103’, considerada suscetível a pérola-da-terra, e ‘Magnólia’, tolerante a pérola-da-terra (BOTTON; COLLETA, 2010).

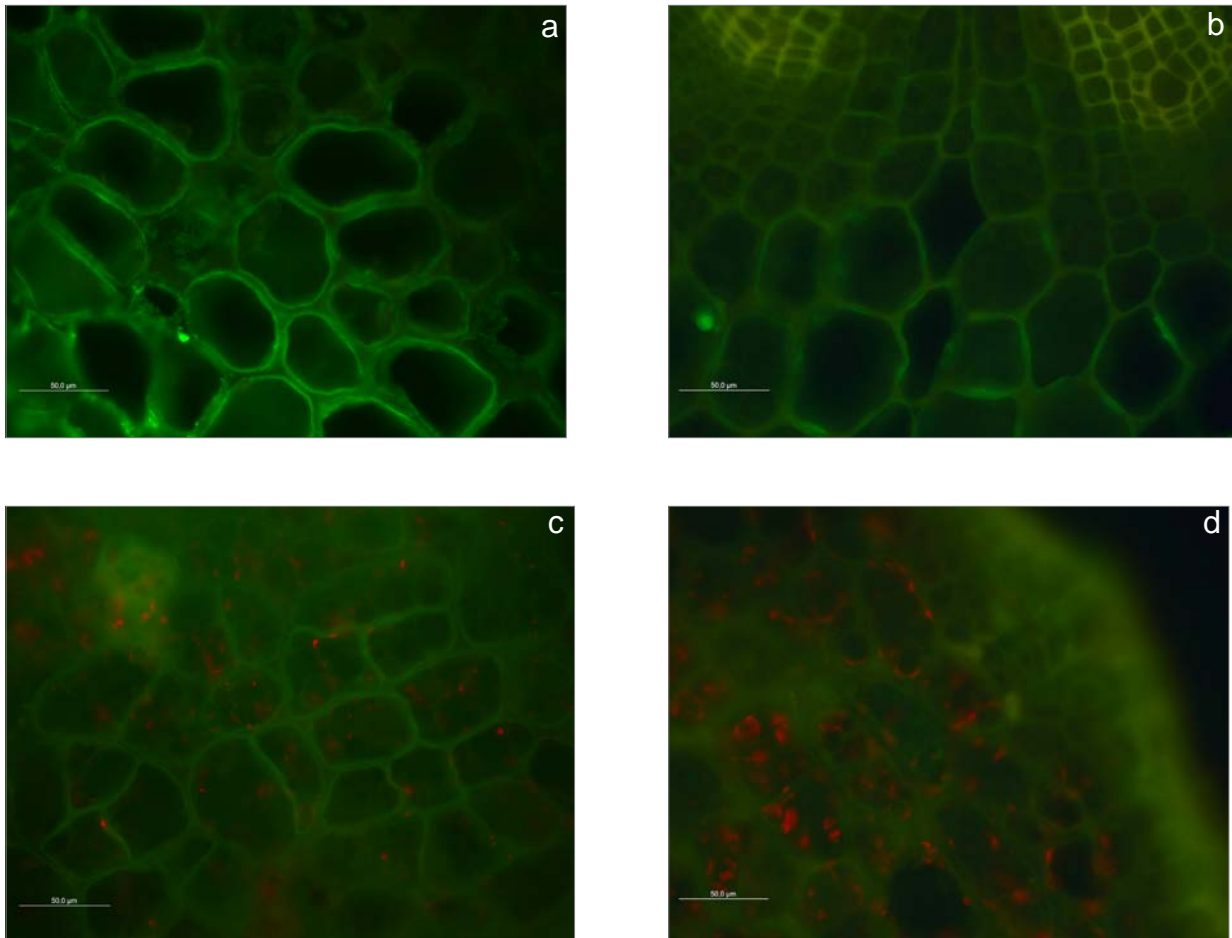


Figura 1 - Cortes transversais de raízes de videiras das cultivares ‘Paulsen 1103’ (a); ‘548-15’ (b); ‘Isabel’ (c) e ‘Magnólia’ (d). Microscopia de fluorescência apresentando emissão de verde pelo fluorocromo ligado ao anticorpo JIM7. Luminescência em vermelho representam grânulos de amido, presentes em amiloplastos em todos os cortes analisados.

A marcação é observada principalmente nas paredes das células do parênquima cortical, embora em ‘Paulsen 1103’ as camadas mais internas da parede primária estão também fortemente marcadas (Figura 1a). No ‘548-15’ e ‘Isabel’ (Figuras 1b e 1c) a marcação é mais homogênea, sendo as paredes mais delgadas do que em ‘Paulsen 1103’. Em ‘Magnolia’ (Figura 1c) a marcação é menos intensa e ausente na região de adesão do que nas demais cultivares. De acordo com Raiola et al. (2011), quanto menor o grau de metilesterificação maior é o grau de suscetibilidade ao ataque de endopoligactonases. Contudo, esta mesma restrição de metilesterificação aumenta o grau de resistência física das paredes celulares, devido a maior interação iônica com cálcio (WILLATS et al., 2001). Com isso, pode-se supor que a tolerância da ‘Magnolia’ à pérola está mais relacionada com a resistência física à penetração dos estiletos bucais do que à restrição bioquímica da degradação enzimática das pectinas na parede. Além disso, se o maior grau de metilesterificação observado no ‘Paulsen 1103’ não for limitante para o ataque de pérola-da-terra, esta cochonilha

pode romper fisicamente a barreira bioquímica pela metilação de pectinas nas raízes que este genótipo apresenta contra o ataque de fungos de solo. Portanto, em presença de pérola-da-terra o ‘Paulsen 1103’ pode se tornar susceptível à outros patógenos do solo.

CONCLUSÕES

O teste imunocitoquímico com anticorpo monoclonal JIM7, marcado com fluorocromo FITC, revelou-se eficiente na distinção de diferentes graus de metilesterificação das paredes celulares entre diferentes cultivares de videira.

A cultivar ‘Paulsen 1103’, mais susceptível ao ataque de pérola-da-terra, apresentou maior intensidade de marcação do epitopo avaliado no parênquima cortical.

A cultivar ‘Magnolia’, menos susceptível ao ataque de pérola-da-terra, apresentou menor intensidade de marcação do epitopo avaliado no parênquima cortical.

REFERÊNCIAS

- BOTTON, M.; COLLETA, V.D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérolada-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 213-216, 2010.
- CAFFALL, K.H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.
- KNOX, J.P.; LINSTED, P.J.; KING, J.; COOPER, C.; ROBERTS, K. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. **Planta**, Berlin, v. 181, n. 512-521, 1990.
- MA, R.; REESE, J. C.; BLACK, W. C.; BRAMEL-COX, P. Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 507-512, 1990.
- RAIOLA, A.; LIONETTI, V.; ELMAGHARABY, I.; IMMERZEEL, P.; MELLEROWICZ, E.J.; SALVI, G.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D. Pectin methylesterase is induced in Arabidopsis upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 24, n.4, p. 432-440, 2011.
- TORREGROSA, L.; BOUQUET A. In vitro propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, Geneva, v.34, n.4, p.237-238, 1995.
- WILLATS, W.G.T., MCCARTNEY, L., MACKIE, W., KNOX, P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 9-27, 2001.