

**“COLÉTERES ESTIPULARES EM *PALICOUREA* AUBL.
(RUBIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS E
FUNCIONAIS”**

CRISTIANE FERRANTE TULLII

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
AGOSTO, 2014**

**“COLÉTERES ESTIPULARES EM *PALICOUREA* AUBL.
(RUBIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS E
FUNCIONAIS”**

CRISTIANE FERRANTE TULLII

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Maura Da Cunha

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
AGOSTO, 2014**

**“COLÉTERES ESTIPULARES EM *PALICOUREA* AUBL.
(RUBIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS”**

CRISTIANE FERRANTE TULLII

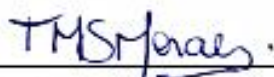
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovado em 14 de agosto de 2014


Comissão examinadora:



Prof. Dra. Claudete Santa Catarina- LBCT/CBB/UENF



Prof. Dra. Tarsila Maria da Silva Moraes- IFF/Campos



Prof.^a Dra. Valdirene Moreira Gomes - LFBM/CBB/UENF



Prof.^a Dra. Maura Da Cunha - LBCT/CBB/UENF (Orientadora)

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

576 / 2014

Tullii, Cristiane Ferrante

Coléteres estipulares em *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae): aspectos estruturais e funcionais / Cristiane Ferrante Tullii. -- Campos dos Goytacazes, 2014.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual.

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Da Cunha, Maura

Bibliografia: f. 86-99

1. Estruturas secretoras 2. Mecanismo de defesa 3. Bactérias benéficas
I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
II. Título

571.6
T918c

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual no setor de Biologia Vegetal, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos e no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA), associados ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação da Dra. Maura Da Cunha, com financiamento de apoio à pesquisa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e bolsa de Mestrado concedida pela FAPERJ.

Agradecimentos

Como de costume, porém com imensa sinceridade, primeiramente agradeço a Deus por me guiar no caminho certo ou me amparar colocando pessoas que pudessem fazê-lo.

Agradeço também...

A minha amiga e orientadora Dra. Maura Da Cunha por me ajudar em todos os momentos, acreditar no meu potencial acima de qualquer coisa e me incentivar a dar o melhor em tudo que eu fizesse.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da UENF e equipe pela estrutura e apoio.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Aos técnicos do LBCT em especial Giovanna Alves e Beatriz Ferreira pelo suporte, amizade e carinho.

Ao SISBIO pela concessão das licenças.

A coordenação do Parque Nacional do Itatiaia representada pela figura do Sr. Léo Nascimento pela ajuda, presteza e inigualável hospitalidade em nossas saídas de campo.

Ao Professor Dr. Sebastião da Silva Neto pela identificação das espécies.

Ao Professor Dr. Fábio Olivares pela grande ideia na minha defesa de projeto e principalmente pelo auxílio para colocá-la em prática.

A Dra. Katia Valevski pela excelente e minuciosa correção da dissertação.

A Nathalia Duarte pela amizade revelada, pelos maravilhosos momentos no NUDIBA, por ser um grande exemplo de profissional e por acreditar tanto em mim.

Aos companheiros de laboratório: Saulo Pireda, Guilherme Rabelo, Germana Bueno, Camilla Alexandrino, Fernanda Trindade, João Vitor Castelar e Glaziele Campbell por nunca negarem esforços em me ajudar e por proporcionarem sempre um ótimo ambiente de trabalho.

As minhas recentes e queridas amigas Nayara Francisco, Dayane Hentzy, Talita Sousa, Rosângela Moreira, Fátima Figueiredo e Fátima Carregal por me acolherem em seu ambiente, confiarem em mim e me tratarem com tanto carinho e atenção.

A minha MELHOR amiga, Alice Guiotti, por se fazer presente mesmo estando tão longe e por atender a todo e qualquer chamado de uma amiga desesperada (eu).

Ao Helio Secco por sua grande e verdadeira amizade e por alegrar até meus momentos mais difíceis.

Aos meus amigos Nathália Torres Dutra, Marcello de Carvalho Pimentel, Jayme Júnior e Annaliza Meneguelli por todo carinho e por me proporcionarem tantos momentos felizes.

Aos meus pais Wilson Silva Tullii e Maria da Glória Ferrante Tullii por terem me dado sempre o melhor que estava ao seu alcance, por me incentivarem nos estudos e sempre reconhecerem todas as minhas vitórias, por menores que fossem.

Ao meu irmão Bruno Tullii pelo companheirismo, pelo exemplo de vida e de superação.

Ao meu irmão Igor Tullii pela companhia, por me proporcionar tantos momentos de alegria e descontração. Dar-me carinho, amor e proteção ao seu modo.

Aos meus primos Mayara Ferrante e Felipe Nonato por não medirem esforços pra me verem feliz.

Aos meus padrinhos, quase pais, Gizelia e Helio Santos por todo amor, colo, auxílio e dedicação.

As minhas primas Nathalia e Camilla Freitas por me dar amor de irmãs.

A minha tia Maria do Socorro e a minha irmã Cíntia Bandeira Tullii pela dedicação e pelo carinho.

A minha avó Maria da Penha pela ajuda e pela preocupação a todo tempo.

E ao meu grande amor e eterno amigo Jonas de Brito Campolina Marques por ter feito o que podia e o que não podia por mim. Pelo cuidado, amor, carinho, dedicação, companheirismo, mimo e principalmente pela paciência. Sem ele nada disso teria sido possível!

Sumário

Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	14
2. Revisão da literatura.....	15
2.1. Família Rubiaceae e o Gênero <i>Palicourea</i>	15
2.2. Estruturas secretoras em plantas	17
2.3. Exsudatos vegetais: sua relação com a defesa e com a interação planta x bactéria	18
2.4. Coléteres	22
2.5. Morte Celular Programada	23
2.6. Senescência.....	26
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
Capítulo 1	28
Anatomia, ultraestrutura e senescência dos coléteres estipulares em <i>Palicourea</i> <i>tetraphylla</i> Cham. & Schldl. e <i>Palicourea rudgeoides</i> (Müll. Arg.) Standl. (Rubiaceae)	28
4. Introdução.....	29
5. Materiais e Métodos	30
5.1. Caracterização da área de coleta	30
5.2. Material Botânico	31
5.3. Microscopia	31
5.3.1. Fixação e Desidratação	31
5.3.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	32
5.3.3. Infiltração e Inclusão do Material	32
5.3.4. Microscopia óptica.....	32
5.3.5. Histoquímicas	32
5.3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
5.4. Análise da Fragmentação do DNA	34
6. Resultados	35
7. Discussão.....	53
8. Conclusões	59
Capítulo 2	60

Coléteres estipulares em <i>Palicourea tetraphylla</i> Cham. & Schltl. (Rubiaceae): perfil proteico e ação antifúngica da secreção e caracterização de bactérias associadas	60
9. Introdução.....	61
10. Materiais e métodos.....	62
10.1. <i>Material Botânico</i>	62
10.2. <i>Extração e dosagem das proteínas</i>	62
10.3. <i>Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC</i>	62
10.4. <i>Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS</i>	63
10.5. <i>Detecção da atividade antifúngica do extrato proteico total da secreção</i>	63
10.6. <i>Análise da morfologia das células e esporos fúngicos</i>	64
10.7. <i>Ensaio de permeabilização da membrana citoplasmática fúngica</i> 64	
10.8. <i>Isolamento das bactérias presentes na secreção e nos coléteres de P. tetraphylla</i>	65
10.9. <i>Capacidade de solubilização de fósforo, manganês e zinco</i>	67
10.10. <i>Caracterização Molecular</i>	67
10.10.1. <i>Extração do DNA genômico</i>	67
10.10.2. <i>Amplificação do gene 16S rRNA</i>	68
10.10.3. <i>Sequenciamento do gene 16S rRNA</i>	68
10.11. <i>Processamento controle com as folhas de P. tetraphylla</i>	68
11. Resultados.....	69
12. Discussão	80
13. Conclusões.....	85
14. Referências Bibliográficas.....	86

Índice de Tabelas

Tabela 1. Relação de tipos de exsudato e sua composição	18
Tabela 2: Composição do meio de cultivo JNFB.....	65
Tabela 3: Composição do meio de cultivo LGL.....	66
Tabela 4: Composição do meio de cultivo DYGS sólido.....	65
Tabela 5: Bactérias isoladas dos coléteres, da secreção e das folhas de <i>P. tetraphylla</i> cultivadas em meios seletivos e não seletivo.....	76
Tabela 6: Identificação das bactérias dos coléteres e da secreção de <i>P. tetraphylla</i> com base nos dados do NCBI e classificação quanto à solubilização de fósforo, manganês e zinco.....	78

Índice de Figuras

Figura 1: Localização do Parque Nacional do Itatiaia (Morim 2006)	30
Figura 2: Ápice caulinar e estípula de <i>P. tetraphylla</i>	31
Figura 3: Ápice caulinar de <i>P. rudgeoides</i>	31
Figura 4: Estereomicroscopia do ápice caulinar e dos coléteres de <i>P. tetraphylla</i>	37
Figura 5: Estereomicroscopia do ápice caulinar e dos coléteres de <i>P. rudgeoides</i>	38
Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura do ápice caulinar e dos coléteres de <i>P. tetraphylla</i>	40
Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura do ápice caulinar e dos coléteres de <i>P. rudgeoides</i>	41
Figura 8: Microscopia óptica dos coléteres de <i>P. tetraphylla</i>	43
Figura 9: Microscopia óptica dos coléteres de <i>P. rudgeoides</i>	44
Figura 10: Microscopia óptica dos coléteres de <i>P. tetraphylla</i> . Testes histoquímicos	46
Figura 11: Microscopia óptica dos coléteres de <i>P. rudgeoides</i> . Testes histoquímicos.....	47
Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão das células secretoras dos coléteres de <i>P. tetraphylla</i>	50
Figura 13: Microscopia eletrônica de transmissão das células secretoras dos coléteres de <i>P. rudgeoides</i>	51
Figura 14: Microscopia óptica dos coléteres de <i>P. rudgeoides</i> . Ensaio TUNEL.....	52
Figura 15: Ensaio de inibição do crescimento de esporos de <i>S. cerevisiae</i>	70
Figura 16: Ensaio de inibição do crescimento de esporos de <i>F. oxysporum</i>	70
Figura 17: Ensaio de inibição do crescimento de esporos de <i>C. albicans</i>	71

Figura 18: Microscopia óptica mostrando a permeabilização da membrana em <i>C. albicans</i>	72
Figura 19: Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura mostrando alterações morfológicas nas três espécies de fungos tratadas com 100 µg/ml do extrato proteico total da secreção.....	73
Figura 20: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do extrato proteico total dos coléteres de <i>P. tetraphylla</i>	74
Figura 21: Eletroforese em gel de tricina da purificação dos peptídeos de coléteres de <i>P. tetraphylla</i>	75
Figura 22: Caracterização das bactérias isoladas de <i>P. tetraphylla</i> quanto à solubilização de fósforo, manganês e zinco.....	79

Resumo: Coléteres são estruturas secretoras de relevância taxonômica que produzem exsudatos que auxiliam na proteção física e/ou química de órgãos vegetais em desenvolvimento contra estresses biológicos e ambientais. A secreção dos coléteres é composta principalmente por mucilagem e por vezes associados a esta secreção, encontram-se microrganismos. Durante o processo de produção até a externalização da secreção, as células secretoras dos coléteres sofrem transformações bioquímicas e ultraestruturais, sendo estas características importantes a serem analisadas para compreender os processos de funcionamento celular durante seu desenvolvimento até sua senescência. Além disso, a presença, distribuição e forma destas estruturas secretoras na superfície adaxial de órgãos vegetativos podem constituir uma característica relevante para a família Rubiaceae e para o gênero *Palicourea*, objeto do nosso estudo. Sendo assim esta dissertação foi dividida em dois capítulos que tiveram como respectivos objetivos: i) caracterizar a anatomia e a ultraestrutura dos coléteres de *Palicourea tetraphylla* e *P. rudgeoides*, durante seu desenvolvimento, buscando elucidar aspectos relacionados aos processos de secreção e senescência, bem como caracterizar a composição da secreção dos coléteres das espécies em questão; ii) analisar possíveis funções da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* relacionadas à defesa antifúngica e à manutenção de uma comunidade de microrganismos benéficos para a planta. Para tanto, ápices vegetativos das espécies foram coletados no Parque Nacional do Itatiaia e processados segundo técnicas usuais em microscopia óptica, histoquímica, microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A secreção de *P. tetraphylla* também foi recolhida e processada para a obtenção de seu extrato proteico total e posterior realização de testes antifúngicos, bem como para o isolamento das bactérias associadas que foram sequenciadas e caracterizadas quanto à capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de ferro, manganês e zinco. As folhas de *P. tetraphylla* também foram analisadas quando a presença de bactérias e os microrganismos encontrados foram caracterizados. Os coléteres de *P. tetraphylla* e *P. rudgeoides* foram vistos como cilíndricos, caracterizados anatomicamente por uma epiderme secretora em paliçada e eixo central parenquimático vascularizado e rico em cristais. As secreções dos coléteres de ambas as espécies foram mucilaginosas com caráter básico, apresentaram proteínas e habitavam muitos microrganismos. Os resultados relacionados ao modo de externalização da secreção em ambos os casos, não foram conclusivos, porém sugere-se que o processo ocorra devido à pressão exercida pelo acúmulo de secreção na parede periclinal externa e no espaço subcuticular. Os estágios de desenvolvimento dos coléteres foram definidos em jovem e senescente, caracterizados por mudanças anatômicas e ultraestruturais nas células secretoras. Em *P. rudgeoides* as células secretoras dos coléteres demonstram sofrer morte celular programada do tipo não-autolítica. A fragmentação precoce do DNA nuclear foi confirmada através do ensaio TUNEL para os coléteres da espécie. O extrato proteico da secreção de *P. tetraphylla* revelou a presença de peptídeos de até 6 kDa. Os resultados obtidos através do ensaio de inibição do crescimento de fungos, somados a permeabilização das membranas desses microrganismos através do teste com SYTOX Green, comprovaram a ação antifúngica da secreção. Diversas bactérias isoladas da secreção e dos coléteres de *P. tetraphylla* mostraram capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fósforo e/ou zinco e/ou manganês mostrando que possivelmente a secreção desses coléteres é responsável por manter uma comunidade de bactérias benéficas para a planta. Bactérias isoladas das folhas também demonstraram essas capacidades.

Palavras chave: Estruturas secretoras, mecanismo de defesa, bactérias benéficas

Abstract: Colleters are taxonomically relevant secretory structures characterized by producing a secretion that helps in physical and or chemical protection of developing organs against biological and environmental stresses. The secretion of colleters is mainly composed by mucilage and sometimes associated with this secretion are found microorganisms. Along the production process until the secretion externalization, the colleter tissues suffer biochemical and ultrastructural changes, which are important features to be analyzed in order to understand of cell functioning during development until their senescence. Moreover, the presence, distribution and shape of these secretory structures on the adaxial surface of vegetative organs may represent an important characteristic for Rubiaceae family and *Palicourea* genus, the object of our study. Therefore this work has been divided into two chapters which had as respective objectives: i) characterize the anatomy and ultrastructure of *Palicourea tetraphylla* and *P. rudgeoides* colleters during its development, aiming to elucidate aspects related to its secretion and senescence processes, and to characterize the composition of these secretion colleters; ii) analyze the possible functions of *P. tetraphylla* colleters secretion related to antifungal defense and maintainance of community of beneficial microorganisms to the plant. For this purpose, shoot apices of booth species were collected in Itatiaia National Park and processed by usual techniques of light, histochemical, scanning and transmission electron microscopy. *P. tetraphylla* secretion was also collected and processed to obtain their total protein extract and subsequent preparations for antifungal activity as well as the for isolation associated bacteria which subsequently sequenced and characterized in their ability to fix atmospheric nitrogen and to solubilize iron, manganese and zinc. The same was done for those bacteria associated the leaves. *P. tetraphylla* and *P. rudgeoides* colleters are cilindrifom and anatomically characterized by a secretory epidermis with palisade central axis and vascularized parenchyma rich in crystals. The colleter secretions of both species where seen to be mucilaginous, with a basic character, presence of proteins, absence of lipids and adequate as the habitat for many organisms. The results related to the externalization mode of secretion in both species, were not conclusive, but we suggest that the process occurs due to the pressure exerted by the accumulation of secretion to the outer periclinal wall and subcuticular space. The developmental stages of colleters were defined as young and senescent, characterized by anatomical and ultrastructural changes in secretory cells. In *P. rudgeoides* the secretory cells of the colleters demonstrate to suffer programmed cell death of a non-autolytic type and early fragmentation of nuclear DNA was confirmed by TUNEL assay for the species. The protein extract of the secretion from *P. tetraphylla* revealed the presence of 6 kDa peptides. The results obtained by testing inhibition of fungal growth, added by the permeabilization of these organisms membranes through testing with SYTOX Green, proved the antifungal effect of secretion. Several bacteria isolated from the *P. tetraphylla* coleters and its secretions showed ability to fix atmospheric nitrogen and to solubilize phosphorus and/or zinc and/or manganese, showing that the secretion of these colleters is possibly responsible for maintaining a community of beneficial bacteria in the plant. Bacteria isolated from leaves also demonstrated these capabilities.

Key words: Secretory structure, defense mechanism, beneficial bacteria

1. Introdução

Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas e apresenta espécies de valor econômico e histórico. É dividida em quatro subfamílias, porém estudos mais recentes têm proposto uma nova divisão em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae e a definição das tribos, dentro das subfamílias, também tem sofrido modificações (Bremer *et al.* 1999; Delprete & Cortés 2004; Delprete & Jardim 2012). Dentre os gêneros da família Rubiaceae encontra-se *Palicourea* que possui cerca de 230 espécies. De acordo com a literatura, este gênero pertence à tribo Psychotrieae. Porém, os limites genéricos dentro desta tribo têm sido questionados. Durante os dez últimos anos, nosso grupo vem caracterizando anatomia e ultraestrutura de gêneros de Rubiaceae, tendo o objetivo de ampliar o conhecimento sobre esta família em remanescentes de Mata Atlântica no Rio de Janeiro, focando em aspectos de anatomia foliar, do lenho, e do eixo reprodutivo e ainda na anatomia ecológica e de estruturas secretoras.

Estruturas secretoras em plantas são responsáveis pela produção de diversas substâncias que desempenham funções como: defesa contra a herbivoria, patógenos, atração de polinizadores e adaptação ambiental (Fahn 1979; Esaú 1985). Estas estruturas se desenvolvem a partir de diferentes tipos de tecidos meristemáticos e, em geral, sofrem transformações relativamente rápidas durante sua diferenciação.

Dentre os tipos de estruturas secretoras existentes em plantas estão os coléteres, que são definidos como glândulas que secretam mucilagem ou resina, ou uma mistura de ambas, e que começam sua atividade secretora numa fase inicial de desenvolvimento. No entanto, outras substâncias também já foram detectadas na secreção destas estruturas, como proteínas (Klein *et al.* 2004; Miguel *et al.* 2006; Vieira *et al.* 2006). A função principal dos coléteres relaciona-se com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, sendo estes lubrificados e protegidos contra dessecação, herbívoros e patógenos (Thomas & Dave 1989b; Thomas 1991; Paiva 2009).

A morfologia, anatomia e ultraestrutura de coléteres, em diversos gêneros da família Rubiaceae, foram recentemente descritas (Klein *et al.* 2004; Miguel *et al.* 2006; 2009; 2010; Tullii *et al.* 2013). Contudo, muitas questões permanecem em aberto. Dentre estas, a elucidação dos processos de secreção e senescência em coléteres.

O processo secretor pode variar com a espécie e ocorre geralmente de forma rápida, dinâmica e envolvendo diversos componentes celulares. Por esta razão, tal

evento tem se tornado uma grande lacuna no estudo da biologia dos coléteres. Em grande parte das publicações, o mecanismo de secreção dos coléteres não é abordado, ou são feitas inferências a partir de observações anatômicas e ultraestruturais. O mesmo acontece com o processo de senescência, que por muitas vezes começa a ocorrer quando o coléter ainda está em atividade, dificultando assim seu estudo.

Pouquíssimos também são os trabalhos que se voltam para o estudo da atividade biológica da secreção. E, sendo o ambiente encontrado em regiões de Mata Atlântica muito úmido e propício para o desenvolvimento de microrganismos, estudos envolvendo relações microrganismos/plantas são necessários para desvendar possíveis interações. Exemplifica esta abordagem, a sugestão de que o exsudato do coléter apresenta papel importante na interação bactéria/planta nos gêneros onde pode ser observada nodulação de bactérias nas folhas (Horner & Lersten 1968; Lersten 1974a; van Oevelen *et. al* 2003).

Assim, acredita-se que a caracterização anatômica e ultraestrutural dos coléteres de espécies do gênero *Palicourea* durante seu desenvolvimento, bem como a investigação dos seus processos de secreção e senescência, possam colaborar para elucidação destes processos em estruturas secretoras, além de contribuir com dados para a sistemática e taxonomia da família Rubiaceae. Além disso, a caracterização da secreção, a avaliação de sua atividade biológica e relação com microrganismos presentes na secreção podem proporcionar o melhor entendimento das funções desse exsudato para as espécies em questão.

2. Revisão da literatura

2.1. Família Rubiaceae e o Gênero Palicourea

A família Rubiaceae apresenta cerca de 9.000 espécies subordinadas a aproximadamente 550 gêneros (Souza & Lorenzi 2008), distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo, porém, as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (Judd *et al.* 1999). No Brasil são encontrados cerca de 120 gêneros e 2.000 espécies (Souza & Lorenzi 2008) distribuídas por diversas formações vegetacionais e apresentando grande ocorrência na Mata Atlântica.

Os membros da família Rubiaceae, com exceções, são facilmente reconhecidos devido à presença de características como folhas opostas com estípulas e ovário ínfero. Embora seja bem caracterizada como uma família, as delimitações de subfamílias, de

tribos e de gêneros têm sido discutidas em razão da grande riqueza e da variedade morfológica de seus caracteres, o que vem provocando muitas mudanças na classificação hierárquica infrafamiliar (Andreasen & Bremer 2000; Piesschaert *et al.* 2000). Robbrecht (1988) propôs uma classificação para Rubiaceae, na qual reconhece quatro subfamílias (Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Rubioideae) abrangendo 44 tribos. Mais recentemente, resultados obtidos com a utilização de marcadores moleculares têm proposto uma nova divisão da família Rubiaceae em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae e a posição e a definição das tribos dentro das subfamílias tem sido indicada e alterada (Rova *et al.* 2002; Delprete & Cortés 2004).

A tribo Psychotrieae está subordinada a subfamília Rubioideae, e inclui muitos gêneros, tais como: *Psychotria* L., *Amaracarpus* Blume, *Cephaelis* Sw., *Chasallia* Comm. ex Juss., *Chazaliella* E.M.A. Petit ex E.M.A. Petit & Verdc., *Geophila* D. Don, *Hydnophytum* Jack, *Hymenocoleus* Robbr., *Myrmecodia* Jack, *Rudgea* Salisb., *Uragoga* Baill e *Palicourea* Aubl.

O gênero *Palicourea* Aubl. possui aproximadamente 230 espécies, distribuídas do México até o nordeste da Argentina. Essas espécies são tipicamente membros do sub-bosque de matas tropicais e poucas delas ocorrem em savanas (Taylor 1997). Na América do Sul, um dos centros de dispersão é a região do Planalto-Centro Sul do Brasil, apresentando cerca de 37 espécies (Coelho & Barbosa 2003). Tal gênero é representado em todo país por cerca de 55 espécies e seis subespécies (Zappi & Taylor 2010).

Estudos moleculares, realizados por Nepokroeff *et al.* (1999) e Andersson (2001), e morfológicos, realizados por Taylor (1996), indicaram que *Palicourea* está intimamente relacionada com *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* Steyererm, inferindo ser *Palicourea* polifilético e derivado deste subgênero. Ainda não existe uma definição sobre a posição do gênero, que se mantém válida devido à morfologia floral, pois *Palicourea* tem flores coloridas e vistosas, separadas em pedúnculos bem desenvolvidos, corolas tubulosas, néctar abundante e outras adaptações relacionadas aos polinizadores, que são beija-flores. Por outro lado, o subgênero *Heteropsychotria* apresenta, em sua maioria, flores pequenas, brancas e polinizadas por insetos (Burger & Taylor 1993; Taylor 1997). Ainda existem muitas lacunas sobre o conhecimento das espécies de *Palicourea*, inclusive para definir a posição do gênero.

O gênero possui plantas arbustivas, arvoretas ou arbóreas, de folhas inteiras,

simples, opostas ou verticiladas. As inflorescências são terminais, paniculadas ou cimosas, comumente coloridas, com flores hermafroditas, geralmente distílicas, com cálice subtruncado ou 5-lobado; corola tubular ou infundibuliforme com um anel de pêlos acima da base gibosa. Os frutos são drupáceos, elipsóides ou subglobosos variando entre de azuis a nigrescentes. As estípulas são unidas ao redor do caule formando uma bainha, caduca ou persistente (Taylor *et al.* 2007). Associadas a estas estípulas encontram-se estruturas secretoras denominadas coléteres.

2.2. Estruturas secretoras em plantas

A atividade secretora é inerente a todas as células vivas (Roshchina & Roshchina 1993), sendo esta característica mais evidente e intensa em alguns tipos celulares. Assim, muitas células apresentam especializações decorrentes de processos de diferenciação que auxiliam ou otimizam sua atividade secretora (Carvalho & Recco-Pimentel 2007). Algumas características citológicas comuns a estas células são paredes primárias delgadas, núcleo conspícuo, citoplasma denso, vacúolos pequenos e numerosas mitocôndrias, que evidenciam alta atividade metabólica (Fahn 1979).

Tais células especializadas podem ocorrer isoladas (idioblastos secretores) ou constituir estruturas altamente diferenciadas como tricomas, emergências, coléteres, canais e laticíferos (Ascensão 2007) e desempenhar diversas funções para a planta como: defesa contra a herbivoria e contra patógenos, atração de polinizadores, adaptação ambiental, entre outros (Fahn 1979; Esaú 1985; Cutter 1986).

Para o desempenho destas funções as estruturas secretoras exibem diferentes graus de complexidade. Sendo assim, vários tipos de classificação para essas estruturas foram propostas levando em consideração aspectos como: a posição que ocupam no corpo do vegetal (Esaú 1965), a natureza química da substância secretada (Lüttge 1971), sua funcionalidade e o trabalho celular envolvido no processo secretor (Fahn 1979). O mesmo tipo ou diferentes tipos de estruturas secretoras podem ocorrer em todos os órgãos da planta ou podem estar limitados a alguns deles e podem exibir diferentes tipos de exsudatos, formato e função (Esaú 1977; Fahn 1979).

No entanto, por vezes, a classificação das estruturas secretoras ainda é uma tarefa difícil para botânicos que estudam o assunto, devido ao fato de possuírem morfologia variável e às vezes não específica ao tipo de secreção. Desta forma, o material secretado em maior quantidade pode ser considerado como determinante para

sua classificação (Fahn 1979), visto que uma combinação de diversos compostos em diferentes proporções é frequentemente encontrada (Castro & Machado 2009).

Em alguns exsudatos estão presentes compostos biologicamente ativos que contribuíram e contribuem para o sucesso evolutivo das espécies que os produzem (Ascensão 2007).

2.3.Exsudatos vegetais: sua relação com a defesa e com a interação planta x bactéria

Uma grande variedade de importantes compostos químicos naturais, utilizados pelo homem através dos tempos, são exsudatos produzidos por células secretoras especializadas de plantas. Cerca de 160 famílias de plantas vasculares produzem exsudatos (Lambert *et al.* 2010), que são classificados de acordo com sua composição química predominante, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Relação de tipos de exsudatos e suas composições

Tipo de exsudato	Composição
Resinas	Misturas de compostos terpenóides e fenólicos que podem ser produzidas em dutos internos ou glândulas superficiais especializadas dos vegetais (Pereira <i>et al.</i> 2006b)
Gomas e Mucilagens	Hidrocoloides vegetais formados por monossacarídeos ou mistura de monossacarídeos, onde muitos são combinados com ácidos urônicos. Diferenciam-se mucilagens de gomas pelo fato das gomas se dissolverem rapidamente em água, ao passo que as mucilagens formam massas viscosas. A distinção também pode ser feita com base no fato de que as mucilagens são produtos fisiológicos, enquanto as gomas são produtos patológicos (Jani <i>et al.</i> 2009).
Gomas-resina	Classe de exsudato misto resultante da combinação de carboidratos e compostos terpenóides (Lambert <i>et al.</i> 2010)
Óleos	Produtos monoterpênicos líquidos de plantas (Lambert <i>et al.</i> 2010)
Látex	Suspensão ou emulsão de pequenas partículas de terpenos (óleos essenciais, resinas) e ceras dispersas em uma solução que contém

	sais, polissacarídeos, ácidos orgânicos, alcaloides, enzimas proteolíticas, etc. A borracha não é um componente universal (Fahn 1979).
Néctar	Combinação aquosa de uma série de substâncias, principalmente sacarose, glicose e frutose (Baker & Baker 1973).
Exsudatos voláteis	Compostos majoritariamente por óleos voláteis - terpenos e compostos fenólicos de baixo peso molecular (Vogel 1990).

Esses exsudatos, apesar de assim classificados por seus componentes mais abundantes, na maioria das vezes são misturas muito complexas, de uma grande diversidade de compostos químicos presentes em menores concentrações, o que os leva a exercer diversas funções na planta, entre estas a proteção contra agentes bióticos e abióticos.

O primeiro registro sobre um exsudato vegetal com atividade antibiótica foi feito em 1928, pelo biólogo Russo Boris Petrovich Tokin, o qual demonstrou que produtos de plantas podem afetar o crescimento de microrganismos (Willis R. J. 2007).

Em uma revisão sobre a atividade pesticida de tricomas, Dayan e Duke (2003) destacam que tricomas glandulares são reconhecidos como sítios de produção concentrada de metabólitos secundários, que ao serem exsudados têm alto potencial antifúngico, como em *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh (Salicaceae) ou propriedades inseticidas como em *Chrysanthemum sp.* (Asteraceae) que produz piretrinas, substância a partir da qual foram desenvolvidos numerosos inseticidas.

Exsudatos de nectários que possuem relações bem estabelecidas com a polinização também estão envolvidos com a defesa de plantas em algumas espécies devido à relação ecológica estabelecida entre o exsudato dessas estruturas e as formigas. O néctar representa uma fonte de recursos alimentares previsíveis e abundantes para diversas espécies de formigas que geralmente exibem comportamento agressivo contra herbívoros (Schultz & McGlynn 2000). A relação com a defesa de plantas e o néctar também se relaciona com descoberta de novas substâncias em sua composição como os ácidos orgânicos (Baker & Baker 1973, Baker & Baker 1975). Como exemplo, incluem-se os terpenos (Ecroyd *et al.* 1995), os alcalóides (Deinzer *et al.* 1977), os flavonóides (Rodriguez-Arce & Diaz 1992), os glicosídeos (Roshchina & Roshchina 1993), os compostos fenólicos (Cabras *et al.* 1999) e os óleos (Vogel 1969).

O exsudato mucilaginoso secretado por coléteres, além de proteger regiões meristemáticas contra a dessecação, também pode possuir proteínas potencialmente relacionadas com defesa de ataques por patógenos. A partir da secreção dos coléteres de *Simira glaziovii* K. Schum (Rubiaceae) foi purificada uma β -1,3-glucanase (Vieira *et al.* 2006). Na secreção de *Bathysa nicholsonii* K. Schum (Rubiaceae) foi detectada uma mistura de proteínas com massas moleculares de 66-24 kDa (Miguel *et al.* 2006) que foi capaz de inibir o crescimento de fungos *in vitro*.

Além de proteínas, peptídeos antimicrobianos também já foram detectados em exsudatos, como reportado por Rose *et al.* (2006) para exsudatos de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Fabaceae). Estas moléculas de baixa massa molecular se destacam por ter uma vasta atividade inibitória contra bactérias, vírus e fungos (Izadphanah & Gallo 2005), sendo eficazes em baixas doses e com ação rápida.

Além da relação com a defesa de plantas, muitos estudos também buscam compreender a interação entre os exsudatos vegetais e os microrganismos. Os microrganismos colonizam microambientes influenciados pelos exsudatos e se beneficiam pelo consumo dos seus componentes, principalmente carboidratos. Este meio representa assim um nicho bastante atraente para estes seres, onde diversas interações podem ser observadas (Cardoso & Freitas 1992). Os microrganismos podem se estabelecer como comensais, sendo indiferentes para a planta, ou trazer benefícios ou malefícios para esta.

Uma relação vastamente estudada é a exsudação de compostos orgânicos, pelas raízes das plantas e consequente atração de microrganismos benéficos. Esses compostos são liberados, ativa ou passivamente, durante todas as fases do desenvolvimento vegetal, em quantidades e composições diversas, variando com a espécie e as condições de estresse às quais a planta está submetida (Jones 1998). O efeito do exsudato sobre os microrganismos pode ser direto, com atração para rizosfera e provimento de nutrientes para o seu crescimento; e indireto, com mudanças no ambiente químico que favoreçam sua sobrevivência (Hawes & Brigham 1992). Da mesma forma, os microrganismos também apresentam a capacidade de beneficiar as plantas por mecanismos diretos (como fixação biológica do nitrogênio, produção de fitormônios, aumento da solubilização e entrada de nutrientes) e por mecanismos indiretos (supressão de patógenos, produção de sideróforos ou antibióticos). Estudos demonstram que plantas exsudam mais de 20 % do carbono fixado para a rizosfera (Marschner 1995), mostrando a importância da manutenção dessa comunidade microbiana pela planta.

Por meio da exsudação de uma grande variedade de compostos, as raízes talvez possam regular a comunidade microbiana na rizosfera (Walker *et al.* 2003). Hungria *et al.* (1997) relataram que exsudatos oriundos de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) e *Zea mays* L. (Poaceae) incrementam a taxa de crescimento de *Rhizobium sp.* e *Azospirillum lipoferum* respectivamente, responsáveis pela fixação biológica nessas plantas. Os flavonóides, exsudados pelas raízes de leguminosas, ativam os genes responsáveis pelo processo de nodulação nas bactérias do gênero *Rhizobium* (Peters *et al.* 1986). Ácidos orgânicos presentes em exsudatos radiculares de variedades de tomate influenciam o aumento da população bacteriana na rizosfera e a colonização das raízes por *Bacillus amyloliquefaciens*, uma bactéria benéfica que produz uma ampla gama de antibióticos com atividade sobre fitopatógenos (Tan *et al.* 2013).

Mesmo um ambiente exposto a rápidas e frequentes mudanças, como a superfície foliar, pode ser habitado por uma diversa comunidade de microrganismos se houver fontes de carbono (Andrews & Harris 2000). Os exsudatos extravasam o interior das plantas, principalmente de áreas com injúrias ou saem a partir de tricomas glandulares ou outras estruturas secretoras (Tukey 1970), que geralmente são os sítios de microrganismos mais populosos da superfície das plantas (Andrews & Harris 2000; Mercier & Lindow 2000).

Borges (2006) mostrou que células mucilaginosas presentes na lâmina foliar de espécies vegetais da família Rutaceae podem exercer influência positiva no estabelecimento bacteriano epifítico, ao exsudarem mucilagem para o filoplano, que serve como fonte de água e nutrientes.

O interior das folhas é um ambiente mais favorável à colonização de microrganismos. A umidade é mais controlada já que a presença de cutícula minimiza as perdas de água e a competição no ambiente endofítico é menor. Os estômatos, quando estão abertos, muitas vezes permitem o acesso dos microrganismos aos espaços intercelulares das folhas (apoplasto) e servem como importante via de colonização interna (Beattie & Lindow 1995, 1999). Lersten & Horner (1967) relataram a importância do exsudato dos coléteres de *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae) para o estabelecimento de uma associação simbiótica com bactérias através da formação de nódulos foliares. De acordo com os autores, a secreção proveniente dos coléteres, juntamente com as bactérias presentes no espaço formado entre as estípulas e os primórdios foliares, penetra pelo poro estomático desses primórdios iniciando a formação dos nódulos bacterianos. Em Rubiaceae, além do gênero *Psychotria* outros

gêneros possuem espécies com nódulos bacterianos nas folhas e coléteres estipulares, como por exemplo, *Pavetta* e *Sericanthe* que pertencem à subfamília Cinchonoide. No entanto, a relação entre o exsudato dos coléteres e a colonização bacteriana nas folhas foi pouco investigada.

2.4. Coléteres

Coléteres são estruturas secretoras encontradas em numerosas famílias de Angiospermae, estando presentes em 379 gêneros de 60 famílias de dicotiledôneas, sendo que a maior presença foi registrada na família Rubiaceae, com 140 gêneros, seguida por Apocynaceae, com 41 gêneros (Thomas 1991).

Estas estruturas foram inicialmente definidas por Hanstein (1848 apud Thomas 1991) como glândulas que secretam mucilagem ou resina, ou uma mistura de ambas, e que começam sua atividade secretora numa fase inicial de desenvolvimento. Thomas (1991) considerou os coléteres, por sua função, como estruturas secretoras cuja secreção protege os meristemas em desenvolvimento. Além disso, estruturalmente os coléteres têm sido definidos como estruturas secretoras constituídas por um eixo central alongado, formado por parênquima fundamental, circundado por um estrato epidérmico em paliçada, sendo as células epidérmicas responsáveis pela secreção (Thomas 1991; Da Cunha & Vieira 1997).

O desenvolvimento de coléteres foi estudado por diversos autores. Em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson (Apocynaceae), Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) descrevem que as células epidérmicas se formam pela divisão anticlinal das células da protoderme do seu local de origem, enquanto que as das subepidérmicas dividem-se periclinalmente para a formação das células do eixo central.

Os coléteres podem se desenvolver em diversas partes da planta: em pecíolos (Johansson 1987), cálices (Robbrecht 1987), brácteas, bractéolas e corola (Thomas & Dave 1989c) e nas estípulas, onde se observa a principal ocorrência em Rubiaceae (Solereeder 1908; Horner & Lerstern 1968; Van Hove 1972; Lersten 1974; Thomas 1991). O exsudato pode ser constituído unicamente por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990; Kronstedt-Robards & Robards 1991), tais como ácidos graxos e compostos fenólicos (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008). A presença de proteínas também já foi detectada na secreção dos coléteres de algumas espécies (Klein *et al.* 2004; Miguel *et al.*

2006; Vieira *et al.* 2006).

Em alguns casos, compostos lipofílicos são produzidos em uma segunda fase de secreção dos coléteres, após o término da exsudação de mucilagem (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Klein *et al.* 2004; Rio 2006). A função biológica desse exsudato envolve o aumento da proteção dos tecidos meristemáticos e de órgãos em desenvolvimento, lubrificando e evitando que sofram com a dessecação, a herbivoria e a ação de patógenos, proteção essa já oferecida de forma física pelas estípulas e cálices, (Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a; Thomas & Dave 1989b; Thomas 1991) e ainda, eventualmente, agem na proteção contra fitófagos e proliferação de fungos (Demarco 2005, Miguel *et al.* 2006; Vieira *et al.* 2006).

O processo de produção e de secreção de substâncias envolve transformações bioquímicas e morfo-ultraestruturais nas células secretoras. Durante esse processo, a ultraestrutura celular é modificada de acordo com a fase da vida da estrutura e/ou do produto a ser produzido (Gaffal *et al.* 2007). Em geral, os coléteres começam a secretar antes da expansão da folha, à qual estão ligados. Para isso, o exsudato é transportado através de vesículas do complexo de Golgi até a membrana plasmática, se fundindo a esta. Então o material a ser secretado acumula-se entre a membrana plasmática e a parede celular, fazendo pressão sobre esta parede (Thomas 1991).

O mecanismo de secreção, ou seja, a forma pela qual o exsudato dos coléteres é externalizado pode variar de acordo com a espécie. Quando há ocorrência de poros na superfície da estrutura, acredita-se que seja o canal para a saída da secreção (Vitarelli & Santos 2009). Quando há cutícula, esta pode se romper e o material ser então liberado para o espaço extracelular (Thomas 1991; Curtis & Lersten 1974; Fjell 1983; Mohan & Inamdar 1986). Entretanto, em alguns trabalhos o exsudato do coléter passa pela parede celular e pela cutícula sem que haja o rompimento (Durkee *et al.* 1984; Miguel *et al.* 2006, 2009, 2010; Tullii *et al.* 2013).

Após sua fase secretora os coléteres, em geral, entram em processo de senescência. Um processo que pode envolver morte celular programada.

2.5.Morte Celular Programada

Relatos sobre morte celular programada datam de 1958, quando o biólogo alemão Rudolf Virchow descreveu um fenômeno degenerativo em células animais, ocasionado por uma série de eventos traumáticos. As células observadas exibiam

caracteres morfológicos e bioquímicos bem distintos. As transformações se caracterizavam pelo aumento no volume celular, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular no espaço intercelular, o que causava um processo inflamatório e danificava as células vizinhas (Torres & Vargas 2003). Tal processo é conhecido hoje como necrose.

Em 1967, outro tipo de morte celular programada foi descrita por Kerr, também em células animais, onde os eventos observados foram retração do citoplasma, condensação da cromatina e alteração na morfologia nuclear, sem, no entanto, haver o rompimento da membrana (Kerr 1965 apud. Kerr 2002). Os eventos descritos caracterizavam o processo de apoptose, porém o uso do termo só foi proposto em 1972 (Kerr *et al.* 1972).

Em plantas, a natureza da morte programada foi demonstrada experimentalmente entre 1980 e 1990 por estudos de morte celular espontânea em mutantes. Embora grande parte do trabalho neste campo tenha atraído análises comparativas com sistemas animais, características distintivas e adaptativas que se correlacionam ao estilo de vida de plantas também começaram a ser reconhecidas (Bozhkov & Lam 2011).

A morte celular programada em plantas é ressaltada por desempenhar um papel essencial em resposta a uma série de estímulos de natureza biótica e abiótica, incluindo os de desenvolvimento (Lam *et al.* 2001). Os sistemas modelo de morte celular em plantas mais bem caracterizados ocorrem durante a formação de elementos de vasos, os processos de senescência e a resposta de hipersensibilidade, que é freqüentemente desencadeada em interações planta-patógeno (Dangl *et al.* 2000). Porém, esse fenômeno já foi observado em outros eventos como degradação de camadas de aleurona durante a germinação, escultura de tecidos tais como a formação do aerênquima lisogênico (Jones 2001), a determinação do sexo da planta, a abscisão foliar (Hadfield & Bennett 1997) e em resposta a episódios de seca e estresse térmico (Willians & Dickman 2008).

Van Doorn & Woltering (2005) consideraram três tipos de morte celular programada em plantas: autofagia, apoptose-símile e necrose-símile.

Autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Esta ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (Danial & Korsmeyer 2004; Lum *et al.* 2005). Este fenômeno consiste no maior sistema de degradação e reciclagem em células eucarióticas (van Doorn & Woltering 2005). No processo autofágico, materiais

citoplasmáticos são envolvidos por vesículas, que são então destinadas aos vacúolos ou lisossomos para degradação (Levine & Klionsky 2004). As características morfológicas da autofagia incluem vacuolização, degradação do conteúdo citoplasmático e ligeira condensação da cromatina (Bursch 2001).

Apoptose-símile consiste em um processo de degradação celular caracterizado morfológicamente por condensação do núcleo e do citoplasma e formação de corpos apoptóticos. Esta é concluída com a remoção desses corpos pelos lisossomos, por fagocitose, realizada por células vizinhas (Fink & Cookson 2005). No entanto, muitos autores discordam do fato de que a “apoptose verdadeira” aconteça nas células vegetais, já que a imersão de corpos apoptóticos e a degradação deles em outra célula nunca foram observadas durante processos de morte celular programada em plantas (van Doorn & Woltering 2005). Por isso, atualmente o termo mais aceito é apoptose-símile.

O processo de morte celular programada necrose-símile ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que não há envolvimento de lisossomos como nos outros casos. O que acontece, aparentemente é a inibição das principais vias biossintéticas, pela desestabilização das membranas, ou por outros modos ainda não desvendados (van Doorn & Woltering 2005).

No entanto, van Doorn (2011) assumiu que a morte celular programada em plantas é dividida em duas grandes classes: autolítica e não autolítica. Na morte autolítica, observa-se liberação de hidrolases vacuolares com a ruptura do tonoplasto, seguida de eliminação rápida de todo citoplasma e, por vezes, da maior parte das paredes celulares. Na morte não-autolítica, a ruptura do tonoplasto e a eliminação do citoplasma ocorrem somente após a célula estar morta.

Mas de um modo geral, em relação à ultraestrutura celular, os caracteres relacionados a este processo são retração do citoplasma, alteração na morfologia nuclear e fragmentação do DNA (Green & Kroemer 1998; Danon *et al.* 2000; McCabe & Leaver 2000; Doorn & Woltering 2005).

Em estruturas secretoras, o processo de morte celular programada foi observado e descrito recentemente em eventos de senescência de coléteres de *Bathysa gymnocarpa* K. Schum. e *B. stipulata* (Vell.) J. Presl (Rubiaceae) por Miguel *et al.* (2010) e *Alseis pickelii* Pilger et Shmale (Rubiaceae) por Tullii *et al.* (2013).

2.6. Senescência

A senescência tem sido definida como um evento regulado geneticamente o qual leva à morte as células, órgãos ou organismos. Em plantas, a senescência é acompanhada por mudanças morfológicas e/ou alterações nas propriedades bioquímicas e biofísicas do metabolismo. Geralmente, o processo começa no núcleo com a degradação de RNAs que codificam certas proteínas no citoplasma, resultando na alteração da membrana plasmática e na perda da capacidade homeostática da célula (Nooden & Leopold 1988; Hoeberichts *et al.* 2005). As consequências fisiológicas de mudanças físicas e químicas nos lipídios de membrana incluem modificações na permeabilidade e perda de atividade enzimática ligada à membrana (Mazliak 1981).

A ocorrência desse processo vem sendo definida para os diversos órgãos das plantas. A senescência em folhas, por exemplo, pode envolver degradação de proteínas, de clorofilas, de ácidos nucléicos e de membranas seguidas pelo transporte de produtos de degradação para outros tecidos da planta. Em frutas e legumes, ocorre a perda das clorofilas, associada a mudanças estruturais e liberação de ácidos celulares e enzimas degradativas (Hodges & Forney 2000).

Em nível de órgão ou tecido, a senescência geralmente é considerada um processo benéfico que permite que a planta se livre de estruturas antigas ou efêmeras ou ainda representa um prelúdio para o enfrentamento de ambientes agressivos (por exemplo, a queda da folha). Entretanto quando se trata do organismo como um todo, este fenômeno é pernicioso, pois diminui a eficiência individual (Roach 1993).

Em coléteres, processos de senescência têm sido observados e anatomicamente bem caracterizados como em *Aganosoma* (Apocynaceae) e *Gardenia* (Rubiaceae) (Dave *et al.* 1987, 1988), *Calotropis* (Apocynaceae) (Kuriachen & Dave 1989), *Roupelia* (Apocynaceae) (Thomas *et al.* 1989) e *Mandevilla* (Apocynaceae) (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000). Porém, as alterações ultraestruturais decorrentes desse processo ainda não foram totalmente desvendadas. Miguel *et al.* (2010) registraram essas alterações em coléteres senescentes de *Bathysa gymnocarpa* e *B. stipulata* e Tullii *et al.* (2013) em *A. pickelii*. De um modo geral, as características observadas são: mudança na coloração do coléter que deixa de ser clara e passa a ser marrom e retração e degeneração do citoplasma das células secretoras de maneira basipetalar.

Na maioria dos casos, senescência de órgãos e plantas representa um evento de

morte celular programada, pelo fato do processo ser geneticamente determinado, sob o controle de reguladores endógenos e requerer ativação ordenada de genes específicos (Hadfield & Bennett 1997). Porém mais estudos são necessários e estão sendo conduzidos para a determinação e elucidação desse processo em estruturas secretoras.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a anatomia e a ultraestrutura dos coléteres de duas espécies do gênero *Palicourea*, encontrados na Mata atlântica, desde seu desenvolvimento até a senescência e analisar possíveis funções da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla*.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Descrever a anatomia e ultraestrutura de coléteres de *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* desde seu desenvolvimento até a senescência;
- ✓ Caracterizar histoquimicamente os coléteres de *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla*;
- ✓ Investigar a presença de proteínas totais na secreção dos coléteres de *P. tetraphylla*;
- ✓ Examinar a atividade antifúngica do extrato proteico total da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla*;
- ✓ Isolar e caracterizar as bactérias associadas à secreção, aos coléteres e as folhas de *P. tetraphylla*;
- ✓ Fazer a caracterização molecular dos isolados bacterianos através do sequenciamento da região do gene 16S rRNA;
- ✓ Avaliar os isolados quanto à capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fósforo, manganês e zinco.

Capítulo 1

Anatomia, ultraestrutura e senescência dos coléteres estipulares em *Palicourea tetraphylla* Cham. & Schltdl. e *Palicourea rudgeoides* (Müll. Arg.) Standl. (Rubiaceae)

4. Introdução

Estruturas secretoras denominadas coléteres são encontradas em partes vegetativas e reprodutivas de um grande número de plantas pertencentes a diversas famílias botânicas. Em Rubiaceae os coléteres são frequentemente encontrados associados à superfície adaxial das estípulas interpeciolares, que são estruturas diagnósticas da família (Robbrecht 1988). Nesta mesma família os coléteres também ocorrem em pecíolos (Johansson 1987), cálice (Robbrecht 1987; Dave *et al.* 1988), brácteas, bractéolas e corola (Thomas & Dave 1989c), variando entre gêneros e espécies, podendo servir de caráter taxonômico para a família que apresenta divergências nas delimitações de subfamílias, tribos e gêneros em razão da grande riqueza e da variedade morfológica de seus caracteres. E, não somente a localização, como também a forma, o mecanismo de secreção e senescência e o conteúdo do exsudato dos coléteres, apresentam variações entre espécies e carecem de estudos mais aprofundados.

Investigações acerca dos coléteres têm sido concentradas principalmente na caracterização anatômica e histoquímica, utilizando os dados encontrados como ferramenta taxonômica (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Simões 2002; Rio *et al.* 2002; Klein *et al.* 2004). No entanto, autores como Miguel *et al.* (2006) e Tullii *et al.* (2013) têm demonstrado que o estudo do processo de senescência em coléteres se revela como um modelo para estudo de morte celular programada em plantas, oferecendo contribuições para o tema. Além disso, essas estruturas secretoras também despertam grande curiosidade na comunidade científica, ainda carente de um conhecimento integral acerca de sua função nos vegetais.

Sendo assim, este estudo se baseou em um tripé constituído por investigações acerca: i) da anatomia e ultraestrutura dos coléteres de *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* em diferentes estágios de desenvolvimento até sua senescência; ii) do exsudato por estes produzidos; iii) e da sua função, fundamentada na estrutura e no conteúdo do exsudato e também com base no contexto ecológico sob o qual as plantas estavam submetidas.

5. Materiais e Métodos

5.1. Caracterização da área de coleta

O Parque Nacional do Itatiaia está localizado no sudoeste do Estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22°15' e 22°30' S e longitudes 44°30' e 44°45' W (Fig. 2) (Morim 2006), com altitudes entre 700 e 2.787. Este parque abrange uma área de 28.155,97ha (Morim 2006). O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo temperado com estação seca (Cwa) (Bernardes 1952). A temperatura média anual, dependendo da altitude, está entre 15 °C e 27 °C. O relevo é montanhoso, incluindo encostas e o topo do planalto, onde emergem notáveis penhascos rochosos. A partir dos 1.600 m até 2.200 m, as comunidades florestais têm seus tamanhos reduzidos permanecendo os elementos florísticos da mata higrófila. Acima dos 2.200 m, as comunidades passam a ser arbustivas, com pequenas manchas de vegetação arbórea. Na região do planalto, a riqueza maior é das ervas, em grande parte esclerificadas. As variações altitudinais permitem que sejam encontradas no Parque (além da típica Floresta Ombrófila Densa Montana), a partir dos 1.600 m de altitude, a Floresta Alto Montana. À medida que se eleva a altitude, segue-se densa cobertura campestre designada por campo de altitude (http://www4.icmbio.gov.br/parna_itatiaia/, recuperado em 13 de dezembro de 2011).

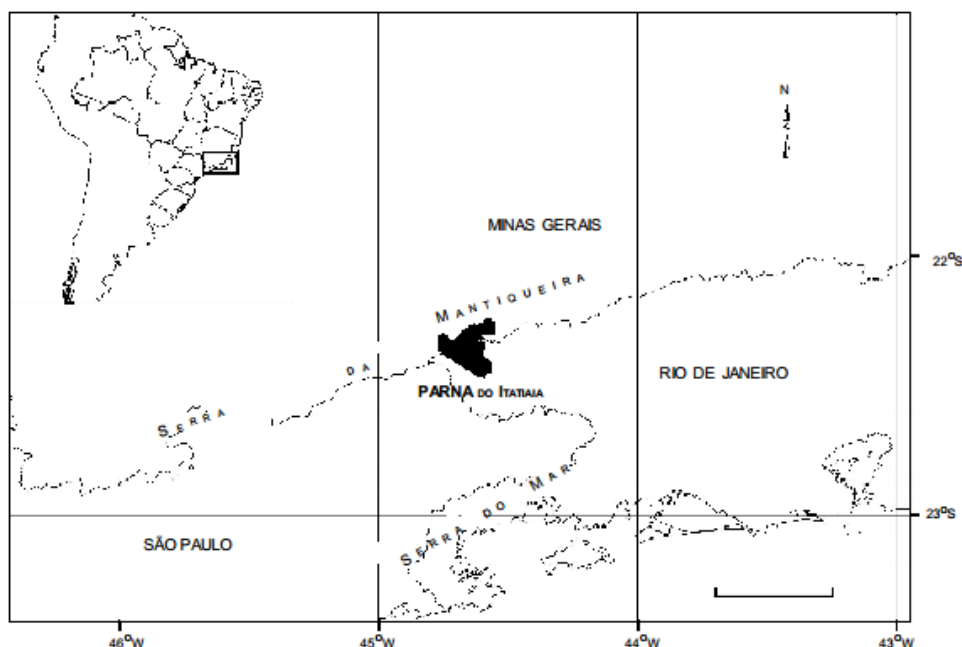


Figura 1: Localização do Parque Nacional do Itatiaia (Morim 2006).

5.2. Material Botânico

Ápices caulinares e estípulas de *P. rudgeoides* e *P. tetraphylla* foram coletados no Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ) e fixados quimicamente no local de coleta para processamento para microscopia. Devido ao fato das estípulas serem caducas foram possíveis de serem coletados 3 nós de estípulas para *P. tetraphylla* e 5 nós de estípulas para *P. rudgeoides*.



Figura 2: Ápice caulinar de *P. tetraphylla* (círculo vermelho) e estípula do segundo nó (círculo azul)



Figura 3: Ápice caulinar de Ramo de *P. rudgeoides* (círculo vermelho)

5.3. Microscopia

5.3.1. Fixação e Desidratação

Ápices caulinares inteiros e estípulas foram fixados em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, a temperatura ambiente no local de coleta.

Posteriormente, fragmentos das estípulas que continham coléteres, foram lavados 3 vezes, por 45 minutos, com tampão cacodilato de sódio 0,05 M e pós-fixados por uma hora em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas novamente com

o mesmo tampão e desidratadas em série cetônica: 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100 % por uma hora em cada etapa.

5.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

Após fixação e desidratação cetônica, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico (CPD 030 Bal-tec®). Desta maneira os danos causados pela tensão superficial associada à evaporação são praticamente eliminados.

Posteriormente, os fragmentos de estípula e ápices caulinares contendo coléteres foram afixados com fita adesiva de carbono e cola de prata, em suportes próprios (“stubs”) e cobertos com uma fina camada de ouro de 20 nm (SCD 050 Bal-tec®). A observação e as eletromicrografias foram obtidas com o uso do microscópio eletrônico de varredura (DSM 962 Zeiss®), a uma voltagem variando até 25 kV.

5.3.3. Infiltração e Inclusão do Material

Os materiais destinados às microscopias óptica e eletrônica de transmissão foram fixados e desidratados como descrito acima. Posteriormente, os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon®), utilizando-se série crescente de resina em acetona. A polimerização da resina foi realizada a 60 °C.

5.3.4. Microscopia óptica

Para a microscopia óptica, após a polimerização da resina, foram feitos cortes semifinos no material (0,60 e 0,70 µm de espessura) em ultramicrótomo (Reichert Ultracuts Leica Instruments®) com auxílio de faca de diamante (Diatome®). As secções foram dispostas em lâminas, coradas com azul de toluidina 0,05% e montadas com lamínulas e Entellan®. A observação foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Axioplan Zeiss®). As imagens foram capturadas através da câmera Cannon Power Shot 14 mpixel (acoplada ao microscópio) com o auxílio do programa Axiovision (Zeiss).

5.3.5. Histoquímicas

Amostras de estípulas, previamente fixadas, foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em historesina (Historesin Leica Instruments®). Posteriormente, foram obtidas secções transversais e longitudinais do material, com 3,0 µm de espessura, através do micrótomo de mesa CUT 4050 (SLEE Technik GmbH). O material seccionado foi disposto em lâminas e submetido a diferentes

corantes/reagentes, para os seguintes diagnósticos químicos:

Compostos pécnicos e mucopolissacarídeos

Os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de vermelho de rutênio 0,02% por 8 minutos (Chamberleim 1932, adaptado). A presença destes compostos foi indicada pela coloração vermelha.

Compostos ácidos e básicos

Os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% por 30 segundos a um pH de 6,8 (O'Brien *et al.* 1964, adaptado). Através da reação metacromática revelada pelo corante, os compostos ácidos adquirem uma coloração azul clara a esverdeada e os compostos básicos adquirem uma coloração roxa/azul escura.

Cutícula

Os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de Auramina O a 0,01% por 5 minutos no escuro (Heslop-Harrison & Knox 1981, adaptado) e foram observados em microscopia de fluorescência (filtro: excitação de 470 a 490nm e emissão de 515 a 565 nm).

Lipídios

Foram feitos testes com o Sudan IV 0,03%, onde o material foi submetido ao corante por 5 minutos (Pearse 1980, adaptado). A detecção acontece por um processo físico em que ocorre partilha entre os lipídios e o solvente do lisocromo (etanol 70%), tendo as moléculas do lisocromo maior afinidade para os lipídios do que para o solvente, revelando assim a marcação de cor vermelha.

Os cortes também foram submetidos ao reagente de NADI (recém-preparado), e mantidos durante uma hora no escuro (David & Carde 1964). O reagente de Nadi é uma mistura de dois componentes incolores, o α -naftol e o cloridrato de dimetilparafileno diamina, que origina por oxidação o azul de indofenol, composto fortemente lipossolúvel que altera a cor por variação do pH, permitindo uma coloração diferencial azulada para terpenóides.

Proteínas

Os cortes foram submetidos ao azul Brilhante de Comassie 0,25% (Fischer 1968, adaptado). Esse corante existe sob duas formas (vermelha e azul). Por ligação do corante à proteína a forma vermelha é convertida na azul, provocando um desvio na banda de absorção máxima de 465 para 595 nm.

Compostos fenólicos

Cortes foram submetidos a uma solução de cloreto de ferro III a 10% durante 15 a 30 minutos (Johansen 1940). Neste teste, os orto-dihidroxifenóis formam complexos com o íon ferro, originando precipitados intensamente corados.

Ácidos graxos

Os cortes foram submetidos às seguintes soluções: acetato de cobre a 0,05% durante 3 horas, EDTA (ácido etilenodiamina tetracético) a 0,1% em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,1, por 5 minutos, ácido rubeânico a 0,1% em etanol 70% durante 30 minutos (Ganter & Jollés 1969, 1970). O método baseia-se na formação de sabões de cobre por reação dos ácidos graxos livres com o acetato de cobre. Os íons de cobre que não formam ligações são eliminados por uma lavagem com EDTA e os que formam são evidenciados pelo ácido rubeânico sob a forma de um precipitado verde escuro.

Lâminas semi-permanentes foram montadas com glicerina e lamínula e o material foi observado em microscópio óptico de campo claro (Axioplan Zeiss®). Os testes foram realizados em triplicata.

5.3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados os mesmos procedimentos que para microscopia óptica, exceto a ultramicrotomia e a contrastação.

Foram feitos cortes ultrafinos (aproximadamente 70 nm de espessura) com o auxílio do ultramicrotomo (Reichert Ultracuts Leica Instruments®) e faca de diamante (Diatome®). Estes foram coletados em grades de cobre de 300 mesh. Em seguida, os cortes foram contrastados com acetato de uranila 5 %, por 40 minutos, e citrato de chumbo, por 5 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, observados no microscópio eletrônico de transmissão (TEM 900 Zeiss®), a uma aceleração de voltagem de 80 KV.

5.4. Análise da Fragmentação do DNA

Ensaio TUNEL

Para a realização do ensaio TUNEL estípulas foram cortadas em pequenos fragmentos e fixadas em FAA 50% durante 2 dias, lavadas em etanol 50%, desidratadas em série ascendente de etanol e, embebidas em historesina (Historesin Leica Instruments[®]). Posteriormente, foram obtidas secções transversais e longitudinais do material, com 3,0 µm de espessura, através do micrótomo de mesa CUT 4050 (SLEE Technik GmbH). O Ensaio TUNEL foi realizado utilizando kit de detecção da morte celular in situ (TMR red, Roche Applied Science), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as secções foram incubadas com proteinase K (SIGMA) durante 20 minutos. Logo após, a mistura de reação do kit TUNEL foi adicionada e as secções incubadas a 37 ° C durante 60 minutos numa câmara úmida, no escuro. As secções foram lavadas três vezes em PBS durante 5 minutos e as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência (filtro UV) com microscópio Axioplan (Zeiss) - comprimento de onda de excitação de 520 a 560 nm (máximo a 540 nm); comprimento de onda de emissão de 570 a 620 nm (máximo de 580 nm), desta forma grupos 3'-OH livres nas terminações de DNAs fragmentados foram detectados.

Um controle negativo foi realizado sem a adição da solução com a enzima desoxinucleotidil transferase terminal. Os ensaios foram realizados em triplicata.

6. Resultados

Para a caracterização proposta, as estípulas do ápice caulinar foram chamadas de estípulas do primeiro nó, as estípulas subsequentes de segundo nó e assim sucessivamente. Para *P. tetraphylla* foi possível coletar estípulas do primeiro ao terceiro nó e para *P. rudgeoides* do primeiro ao quinto nó.

Sob estereomicroscópio foi possível observar que os ápices caulinares de *P. tetraphylla* estavam cobertos por uma secreção branca leitosa e abundante (Fig. 4 A) e que possuíam muitos coléteres (Fig. 4 B) agrupados formando um triângulo, onde no centro de aglomeração os coléteres ocupavam uma maior extensão da estípula e na periferia havia uma gradual diminuição (Fig. 4 C, F). Os coléteres do primeiro nó tinham coloração branca (Fig. 4 C), caracterizando estruturas jovens, e por vezes coloração castanha apenas no ápice da estrutura (Fig. 4 D), caracterizando coléteres no início da senescência, que ocorre do ápice para a base. No segundo nó foi possível

observar coléteres jovens e também coléteres com a senescência mais acentuada (Fig. 4 E, F). No terceiro nó, foi notável o avanço do processo de senescência com a maioria dos coléteres apresentando-se castanhos ou enegrecidos, no entanto, alguns coléteres jovens também foram observados (Fig. 4 G-I). O ápice de *P. rudgeoides* apresentava secreção hialina e escassa (Fig. 5 A). Os coléteres possuíam a mesma distribuição observada no ápice de *P. tetraphylla* (Fig. 5 B-F). Coléteres do primeiro nó tinham coloração amarelada e por vezes coloração castanha apenas no ápice da estrutura (Fig. 5 B,C). No terceiro, quarto e quinto nós foi possível observar o avanço da senescência nos coléteres que se tornam enegrecidos (Fig. 5 D-F).

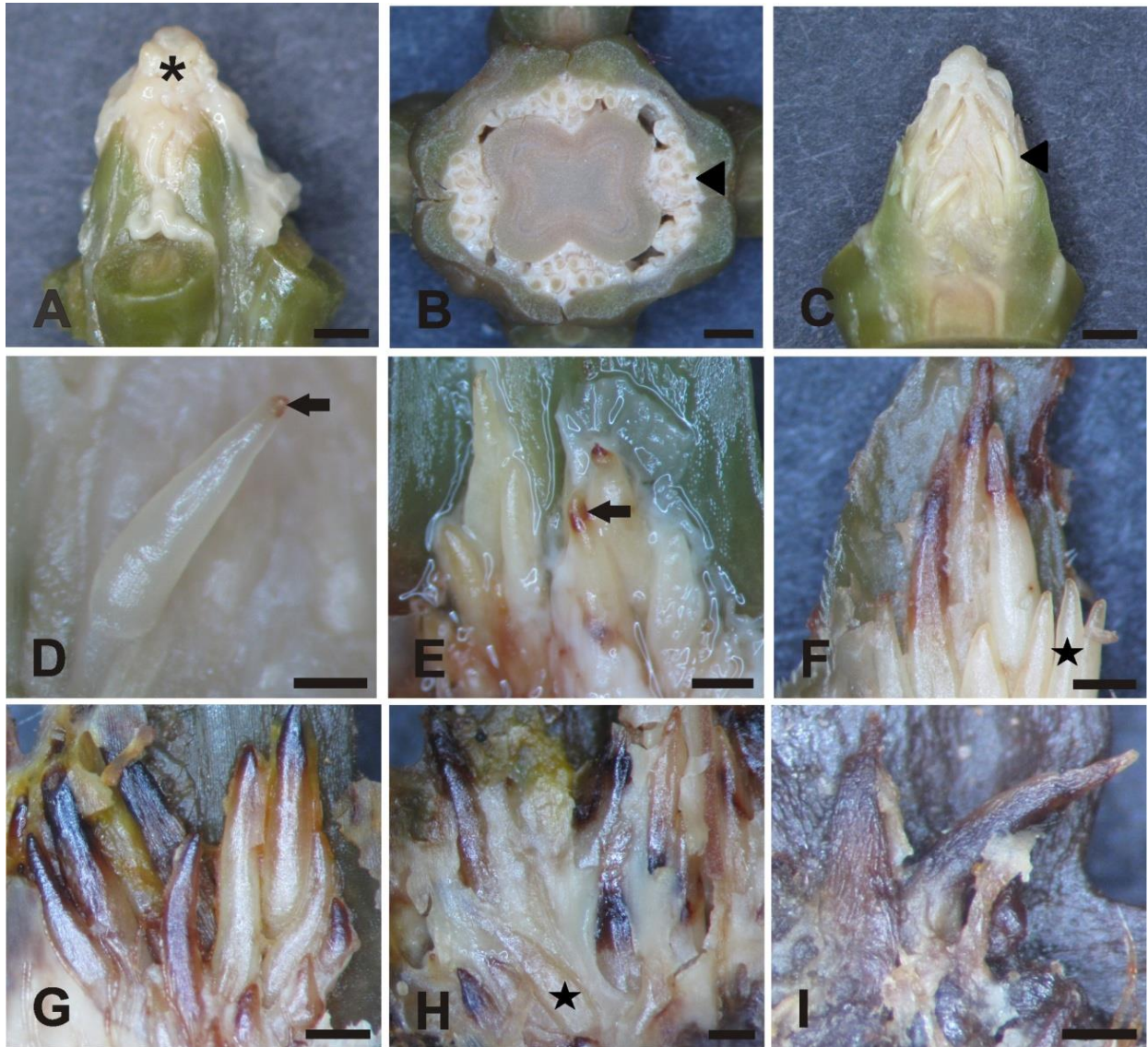


Figura 4: Estereomicroscopia do ápice caulinar e dos coléteres de *P. tetraphylla*. **A** Ápice caulinar coberto de secreção (*) **B** Corte transversal do ápice caulinar revelando muitos coléteres (triângulo) **C** Coléter do primeiro nó com coloração branca (triângulo) **D** Coléter do primeiro nó mostrando senescência no ápice (seta). **E, F** Coléteres no segundo nó mostrando avanço da senescência do ápice para a base (seta) e coléteres jovens (estrela) **G-I** Coléteres do terceiro nó enegrecidos, com senescência avançada e outros com coloração branca, mostrando-se jovens (estrela). Barras: **A-C** 1 mm; **D** 0,25mm; **E, I** 0,5mm.

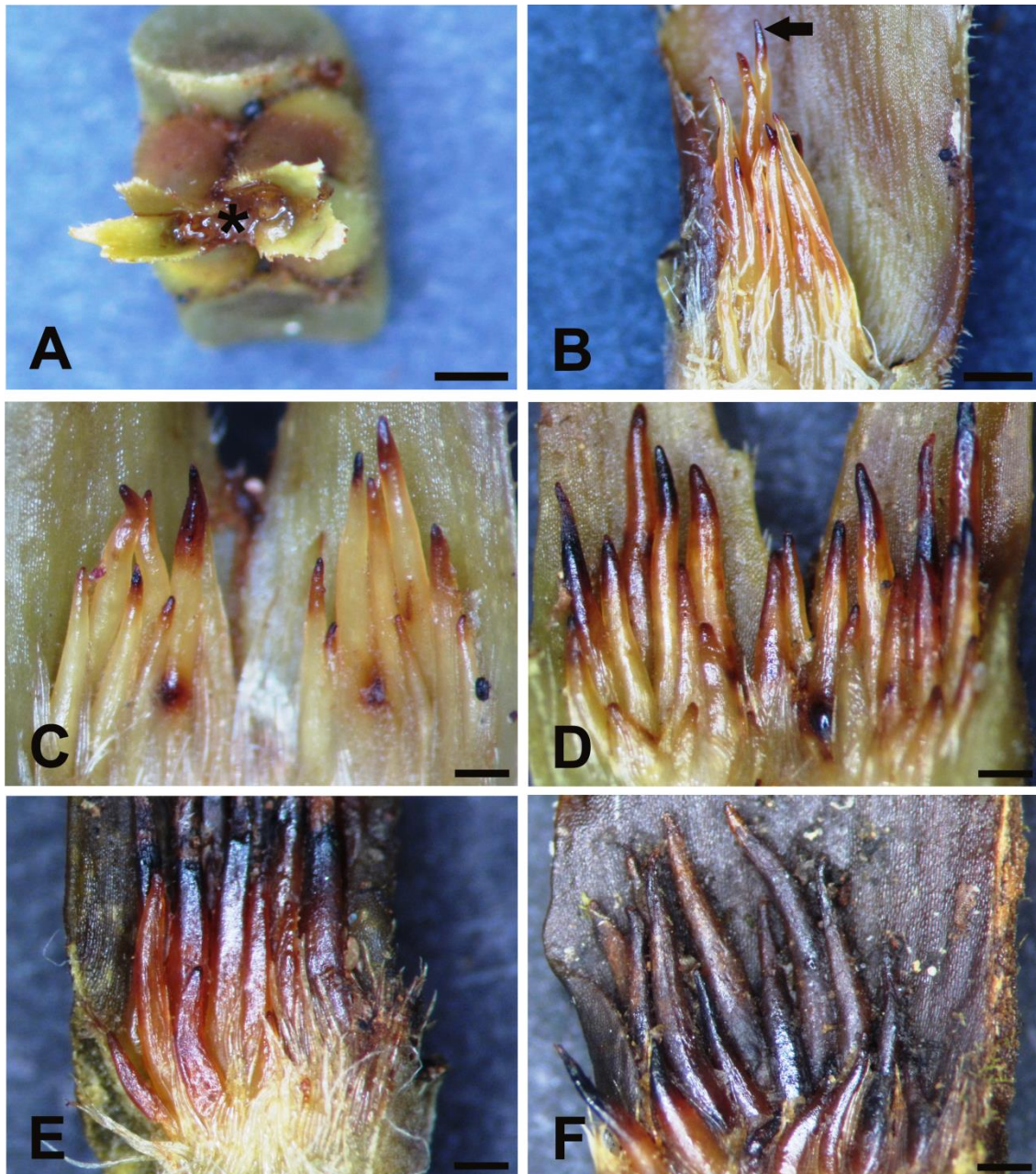


Figura 5: Estereomicroscopia do ápice caulinar e dos coléteres de *P. rudgeoides*. **A** Ápice caulinar com secreção (*). **B, C** Coléteres do primeiro e segundo nós, respectivamente, mostrando senescência no ápice (seta). **D-F** Coléteres, terceiro (**D**), quarto (**E**) e quinto (**F**) nós mostrando avanço da senescência do ápice para a base. Barras: **A** 1 mm; **B-F** 0,5mm.

Em microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a organização do ápice caulinar de *P. tetraphylla*, com primórdios foliares circundados por um par de estípulas repleta de tricomas (uma estípula foi retirada para a melhor visualização) e coléteres cilíndricos emergindo da base das estípulas (Fig. 6 A). Em um detalhe, dos coléteres presentes no ápice caulinar, (ou seja, coléteres de estípulas do primeiro nó) é possível notar que sua superfície aparenta turgidez (Fig. 6 B). Em estípulas do segundo e terceiro nós notam-se coléteres com ápices enrugados (Fig. 6 C e D) ou completamente enrugados (Fig. 6 E) e também coléteres com aparência túrgida (Fig. 6 F), evidenciando que o processo de desenvolvimento, secreção e senescência ocorrem em tempos diferentes para coléteres de estípulas do mesmo nó. Na superfície dos coléteres do segundo e terceiro nós foram notadas protuberâncias na parede, possivelmente relacionadas ao acúmulo de secreção e processo secretor (Fig. 6 G-I). Os coléteres de *P. rudgeoides* apresentaram mudança gradativa em sua superfície no decorrer dos nós subsequentes ao contrário de *P. tetraphylla*, que apresenta coléteres em diferentes estágios num mesmo nó. Numa vista frontal dos coléteres do primeiro nó, observamos o contorno das células através da cutícula (Fig. 7 A), do segundo ao quarto nó, o acúmulo de secreção no espaço subcuticular causa distensão da cutícula em diferentes graus, gerando abaulamentos na superfície (Fig. 7 B-D). Coléteres do quinto nó também possuem estes abaulamentos, no entanto, apresentam somente o ápice enrugado ou uma maior parte de sua extensão (Fig. 7 E). Também foram observados tricomas tectores ao redor dos coléteres das duas espécies (Fig. 6 E e 7 C).

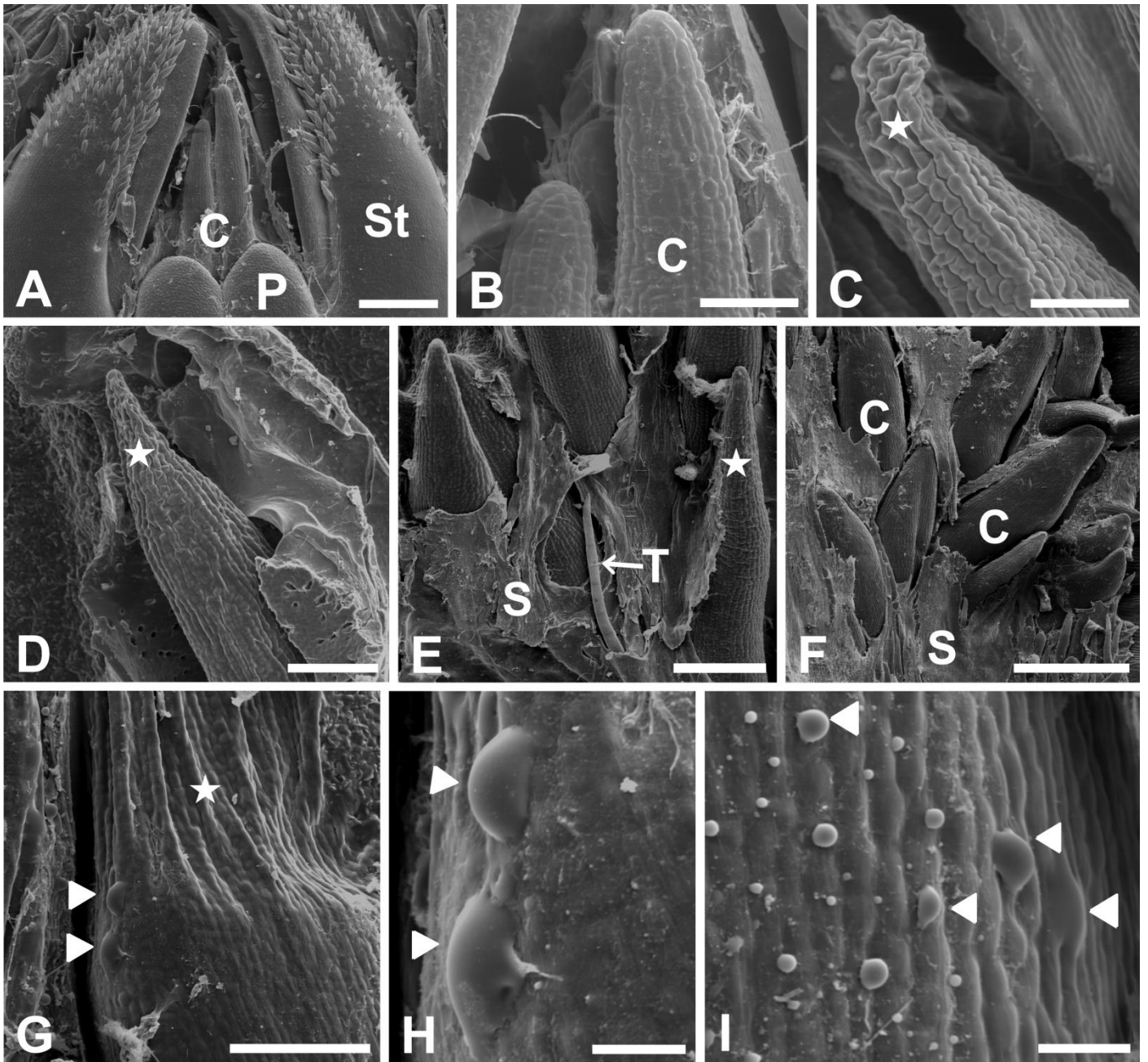


Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura do ápice caulinar e dos coléteres de *P. tetraphylla*. **A** Coléteres do primeiro nó emergindo da base das estípulas **B** Detalhe dos coléteres da micrografia **A**, evidenciando sua superfície túrgida. **C**, **D** Coléteres do segundo e terceiro nós, respectivamente, com os ápices enrugados (estrela). **E** Coléter do terceiro nó totalmente enrugado (estrela) **F** Coléteres do terceiro nó túrgidos **G - I** Coléteres com proeminências em suas paredes celulares (ponta de seta). C=coléter, S= secreção, St= estípula, P= Primórdio foliar, T= Tricomas tectores. Barras: **A**, **C** 200µm; **B**, **E** 50µm; **D**, **G** 100 µm; **F** 500 µm; **H**, **I** 20 µm.

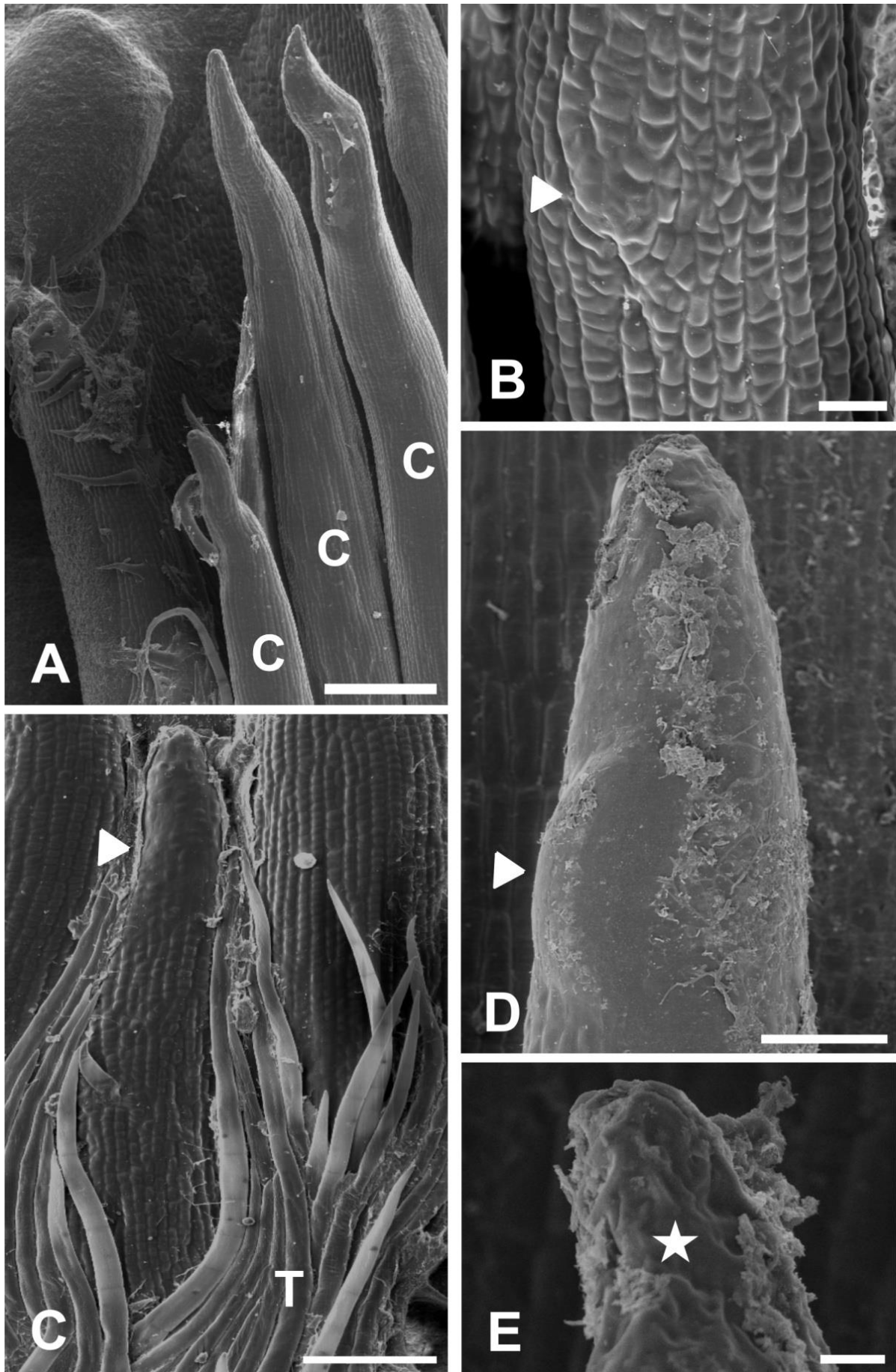


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura do ápice caulinar e dos coléteres de *P. rudgeoides*. **A** Vista frontal dos coléteres do primeiro nó. Note o contorno das células através da cutícula **B, C, D** Coléteres do segundo, terceiro e quarto nós, respectivamente, exibindo distensão da cutícula causada pelo acúmulo de secreção no espaço subcuticular (ponta de seta) **E** Coléter do quinto nó com o ápice enrugado (estrela). C=coléter, T= tricoma. Barras: **A** 250µm; **B** 25µm; **C** 100µm; **D** 50 µm; **E** 20 µm.

Em microscopia óptica, cortes transversais e longitudinais dos coléteres de *P. tetraphylla* revelaram que os coléteres apresentam eixo central parenquimático, circundado por um estrato epidérmico em paliçada (Fig. 8 A, B, C e E). Coléteres do primeiro nó (Fig. 8 A) apresentam células túrgidas e sem acúmulo de secreção nos espaços intercelulares, o qual se revela em coléteres do segundo e terceiro nós (Fig. 8 B, C e E). No entanto, é notável o acúmulo de secreção ao redor dos coléteres de todos os nós (Fig. 8 A-E) e a vascularização do eixo central (Fig. 8 C, E – G). No segundo nó foi possível observar coléteres jovens (Fig. 8 B) e também coléteres senescentes (Fig. 8 C), assim como visto sob estereomicroscópio. Estes apresentavam células totalmente degradadas. No eixo central dos coléteres de *P. tetraphylla* foram visualizados inúmeros cristais estilóides e feixes de ráfide (Fig. 8 F, H). Os coléteres de *P. rudgeoides* também apresentam organização em eixo central parenquimático, circundado por um estrato epidérmico em paliçada (Fig. 9 A-F). Coléteres do primeiro nó apresentam células túrgidas e um ligeiro acúmulo de secreção nos espaços intercelulares (Fig. 9 A). Este aumenta em coléteres do segundo nó que também apresentam secreção acumulada no espaço subcuticular (Fig. 9 B). Foi notável a presença de secreção ao redor dos coléteres do primeiro e segundo nós (Fig. 9 A e B) e por muitas vezes a presença de microrganismos nessa secreção (Fig. 9 C). Nesta espécie todos os coléteres do terceiro nó observados já se apresentam senescentes, com células do eixo e da epiderme desorganizadas e com aparente degradação citoplasmática (Fig. 9 D). Este processo segue nos coléteres dos nós subsequentes (Fig. 9 E e F). A presença de cristais no eixo central foi evidente ao realizarmos cortes mais espessos do material (Fig. 9 G) e a vascularização do eixo central também foi notada em coléteres desta espécie (Fig. 9 H).

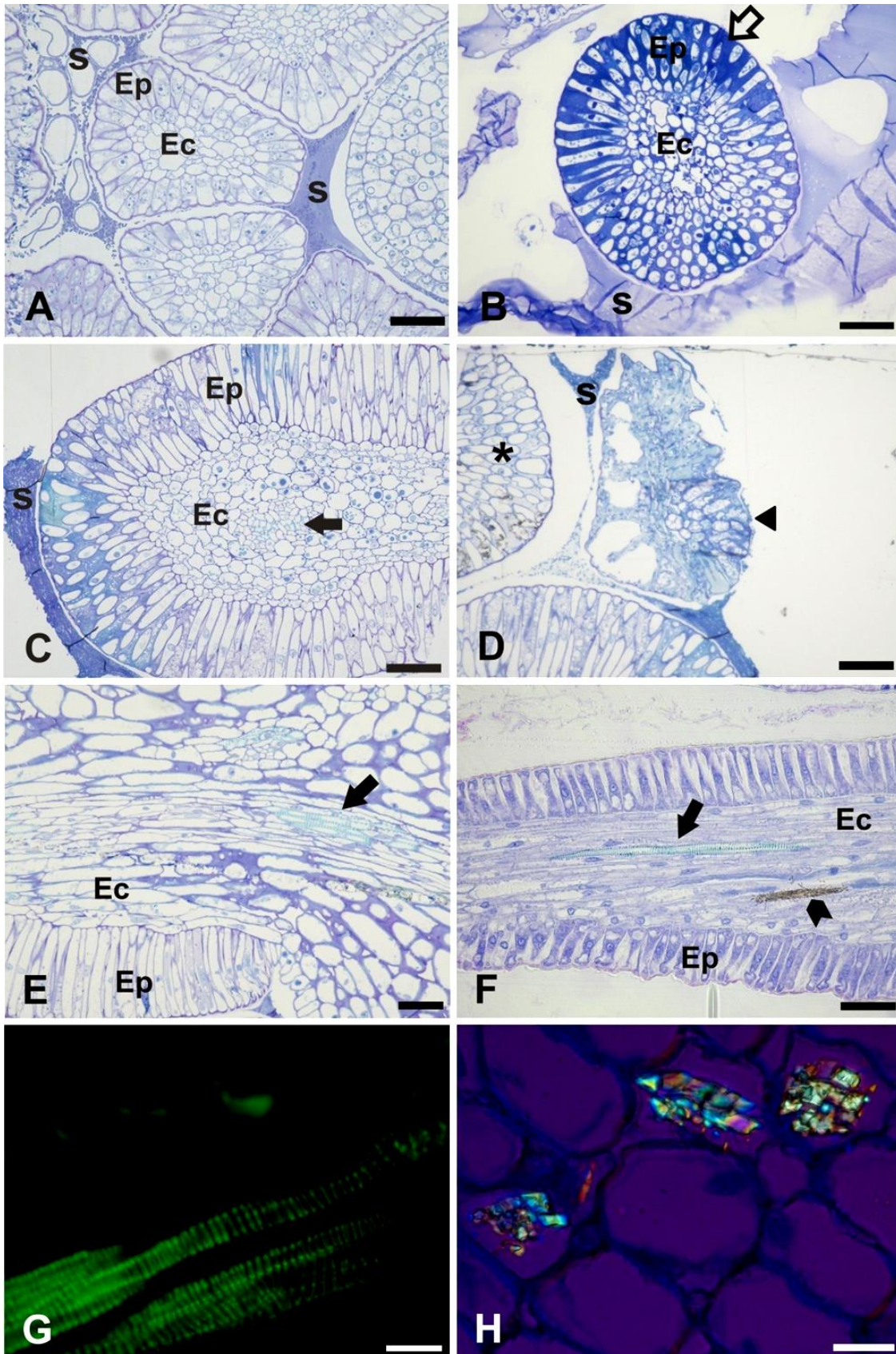


Figura 8: Microscopia óptica dos coléteres de *P. tetraphylla*. **A** Corte transversal de um coléter do primeiro nó evidenciando eixo central circundado por epiderme em paliçada e acúmulo de secreção **B** Corte transversal de um coléter do segundo nó evidenciando acúmulo de secreção nos espaços intercelulares (seta vazia) **C** Coléter do segundo nó exibindo vascularização no eixo central **D** Corte transversal de coléteres do segundo nó, mostrando a epiderme de um coléter jovem (asterisco) e um coléter senescente (triângulo). **E** Corte longitudinal de um coléter do terceiro nó evidenciando vascularização na sua base (seta cheia). **F** Coléter com elemento de vaso no eixo central (seta) e cristais de ráfide (ponta de flecha) **G** Detalhe dos elementos de vaso do eixo central de um coléter em microscopia de fluorescência **H** Cristais estilóides sob luz polarizada no eixo central de um coléter. Ep= Epiderme, Ec= Eixo central S= secreção. Barras: **A, B, D, E** 40 μ m; **C-F, H** 20 μ m; **G** 10 μ m.

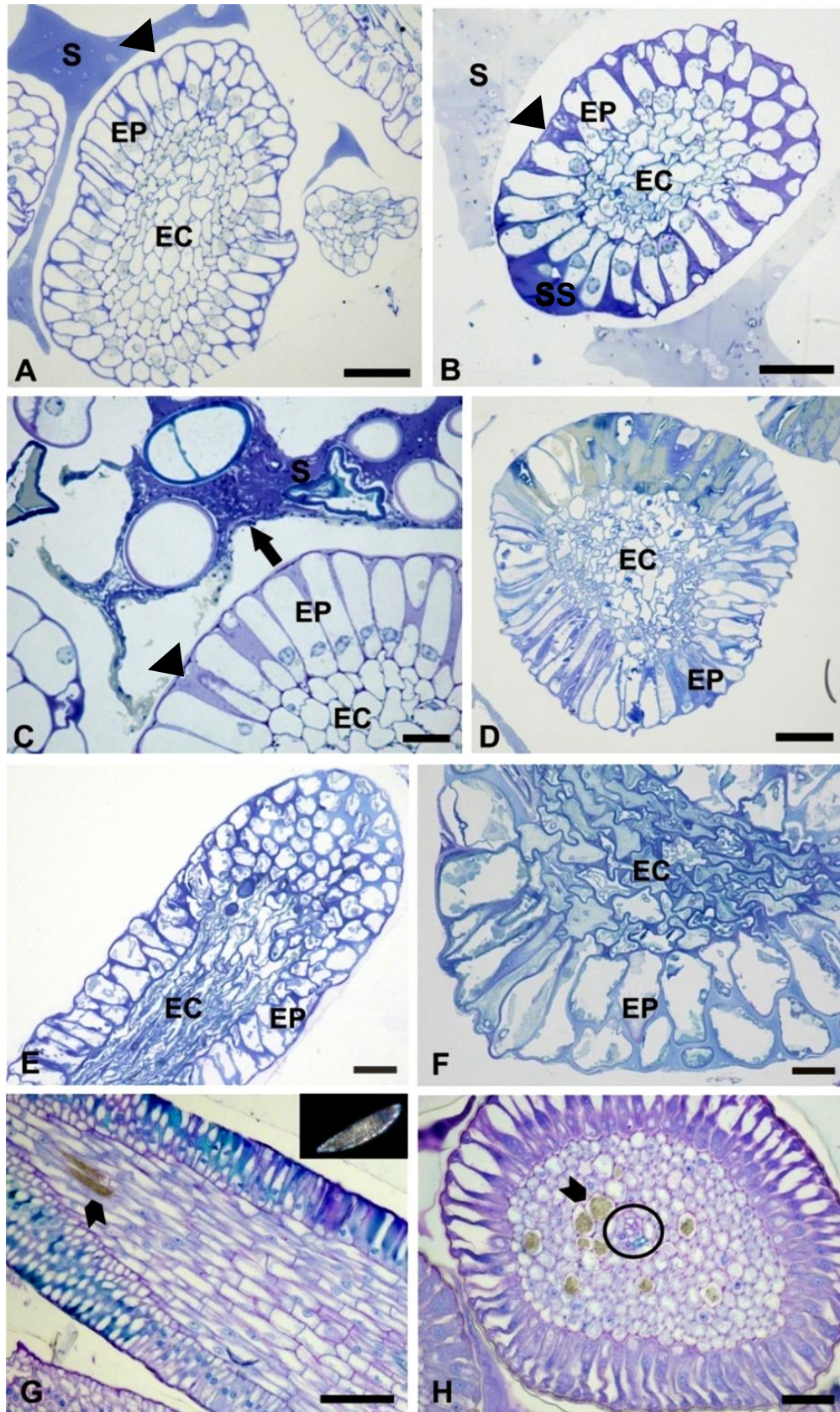


Figura 9: Microscopia óptica dos coléteres de *P. rudgeoides*. A Corte transversal de um coléter do primeiro nó evidenciando eixo central circundado por epiderme em paliçada e acúmulo de secreção tanto no exterior do coléter quanto no espaço intercelular (ponta de seta) B, C Corte transversal de coléteres do segundo nó evidenciando aumento de acúmulo de secreção nos espaços intercelulares (ponta de seta) e também no espaço subcuticular (SS) C Note microrganismos na secreção que se acumula ao redor do coléter (seta) D, E, F Corte transversal de coléteres do terceiro, quarto e quinto nó, respectivamente com epiderme e eixo central desorganizados e degradados evidenciando o processo de senescência do coléter G Corte longitudinal evidenciando cristais no eixo central do coléter (ponta de flecha). Note um cristal sob luz polarizada no insert H Corte transversal de um coléter vascularizado com diversos cristais em seu eixo central (ponta de flecha), note a vascularização (círculo). Ep= Epiderme, Ec= Eixo central, S= secreção, SS= espaço subcuticular. Barras: A, B, D 50 μ ; C, E, F, G, H 20 μ .

Nas análises histoquímicas dos coléteres de *P. tetraphylla* e *P. rudgeoides* a reação com o vermelho de Rutênio indicou que a secreção é rica em mucopolissacarídeos assim como uma das camadas da parede (Fig. 10 A e 11 A). Teste com reagente de Nadi (Fig. 10 B e 11 B), Sudan IV (Fig. 10 C e 11 C) e Auramina O. (dado não mostrado) evidenciaram que os coléteres são cobertos por cutícula. A reação metacromática do azul de toluidina mostrou que a secreção possui compostos básicos, evidenciados pela coloração azul-arroxeadada (Fig. 10 D e 11 D). Através do teste com o azul brilhante de Coomassie, notou-se a presença de proteínas tanto nas células parenquimáticas e secretoras, quanto na secreção (Fig. 10 E e 11 E). O teste para compostos fenólicos com o cloreto férrico foi positivo somente em coléteres de *P. tetraphylla* (Fig. 10 F). A reação com ácido rubeânico (Fig. 10 F) foi negativa para coléteres jovens (Fig. 11 F) e positiva para coléteres senescentes (Fig. 10 G e 11 G), mostrando que o acúmulo de ácidos graxos no tecido só acontece nesta fase. A reação metacromática do azul de toluidina em coléteres senescentes evidenciou a mudança do caráter básico para ácido, com a coloração passando do azul-arroxeadado ao verde, em tecidos senescentes (Fig. 10 H).

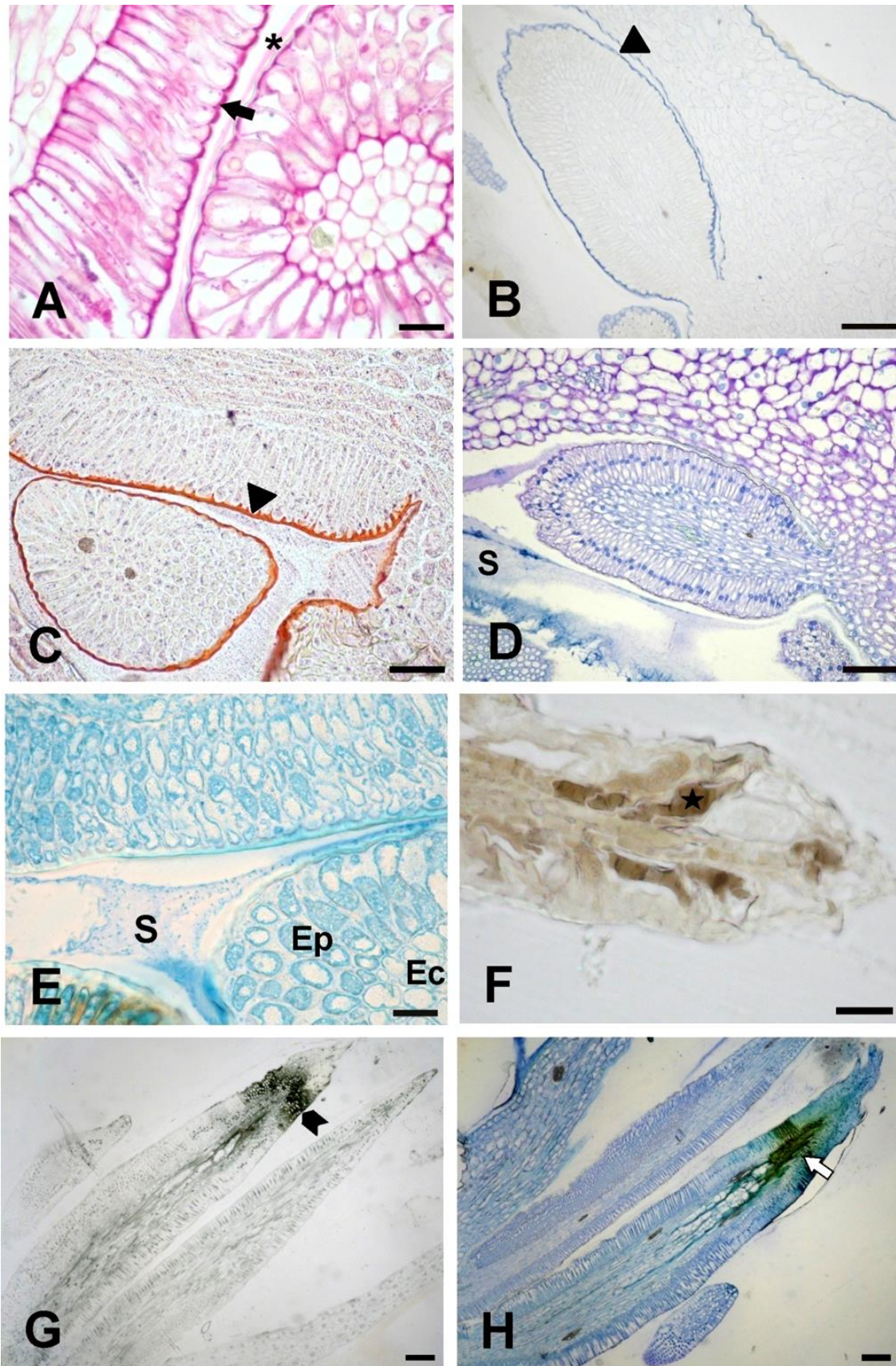


Figura 10: Microscopia óptica dos coléteres de *P. tetraphylla*. Testes histoquímicos. **A** Teste com vermelho de Rutênio em coléter jovem evidenciando uma rica camada polissacarídica na parede (seta) e marcação na secreção (asterisco) **B**, **C** Testes com reagente de Nadi (**B**) e Sudan IV (**C**) evidenciando que o coléter é coberto por cutícula (triângulo) **D** Coléter jovem corado com azul de toluidina, evidenciando a presença de substâncias básicas na secreção **E** Teste com azul brilhante de Coomassie evidenciando a presença de proteínas **F-H** Testes mostrando o acúmulo de compostos fenólicos (**F**), ácidos graxos (**G**) e substâncias ácidas (**H**) em coléteres senescentes. Ep= Epiderme, Ec= Eixo central S= secreção. Barras: **A**, **E**, **F** 20 µm; **B-D** 50 µm; **G**, **H** 100 µm.

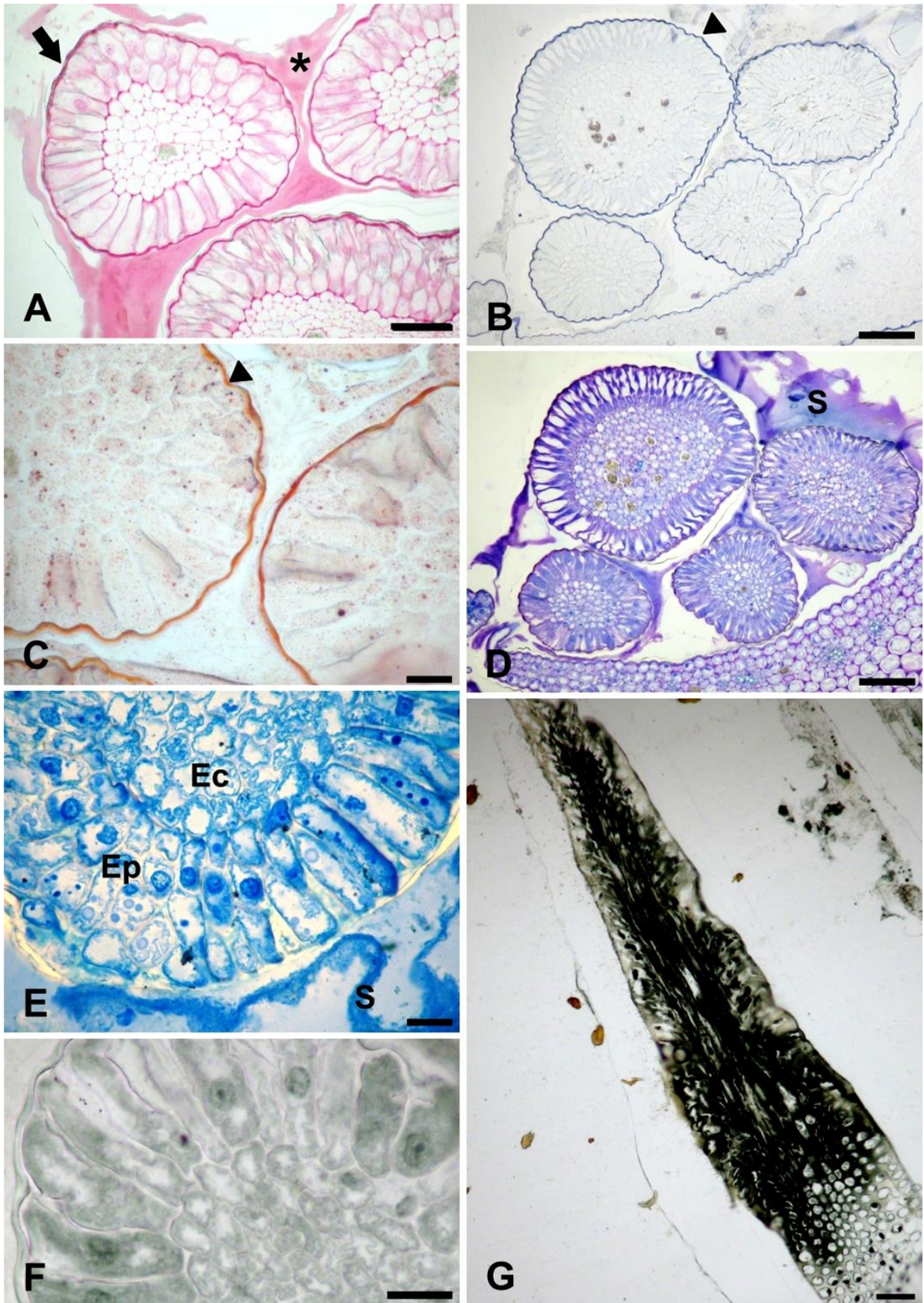


Figura 11: Microscopia óptica dos coléters de *P. rudgeoides*. Testes histoquímicos. **A** Teste com vermelho de Rutênio em coléter jovem evidenciando uma rica camada polissacarídica na parede (seta) e marcação na secreção (asterisco) **B, C** Testes com reagente de Nadi (**B**) e Sudan IV (**C**) evidenciando que o coléter é coberto por cutícula (triângulo) **D** Coléter jovem corado com azul de toluidina, evidenciando a presença de substâncias básicas na secreção **E** Teste com azul brilhante de Coomassie evidenciando a presença de proteínas **F** Teste negativo para ácidos graxos em coléters jovens **G** Teste positivo para ácidos graxos em coléters senescentes. Ep= Epiderme, Ec= Eixo central S= secreção. Barras: **A** 50 µm; **B, D** 100 µm; **C, E, F** 20 µm; **G** 200 µm.

Na ultraestrutura das células secretoras dos coléteres do primeiro nó de *P. tetraphylla* observamos núcleo conspícuo com distinção clara entre eucromatina e heterocromatina e envelope nuclear com aparência preservada (Fig. 12 A). O citoplasma periférico apresentava grande vacúolo, elementos do retículo endoplasmático rugoso dispostos concentricamente (Fig. 12 B), mitocôndrias e plastídios (Fig. 12 C). No entanto ainda no primeiro nó, algumas células apresentavam microrganismos em seu interior e citoplasma totalmente degradado (Fig. 12 D). No segundo e terceiro nós, algumas células secretoras apresentavam núcleo com cromatina condensada com distribuição irregular e envelope estruturalmente alterado (Fig. 12 E) caracterizando a morte celular. Também foi notado acúmulo de amiloplastos (Fig. 12 F) e diversas mitocôndrias (Fig. 12 G); entretanto, a maioria das células secretoras apresentava microrganismos em seu interior e citoplasma totalmente degradado, no qual não era possível distinguir organelas, nem mesmo o núcleo (Fig. 12 H, I). Devido a este fato, a caracterização do processo de morte celular programada dos coléteres desta espécie não foi realizada.

Em *P. rudgeoides* as células secretoras do primeiro nó também apresentavam citoplasma periférico, um grande vacúolo com membrana íntegra em algumas células (Fig. 13 A), retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi pouco desenvolvido, muitas mitocôndrias (Fig. 13 B) e um núcleo conspícuo com distinção clara entre eucromatina e heterocromatina e envelope nuclear preservado (Fig. 13 C). Em algumas células foi possível notar a presença de plasmodesmas nas paredes anticlinais (Fig. 13 D). No segundo e terceiro nós, observamos elementos do retículo endoplasmático rugoso próximo ao núcleo e a parede celular (Fig. 13 E), também foi notável a presença de gotas lipídicas (Fig. 13 F) no citoplasma e inúmeras mitocôndrias agrupadas na periferia nuclear e no citoplasma (Fig. 13 G, H). Plastídios com conteúdo elétron lucente foram frequentemente observados (Fig. 13 H). A secreção foi caracterizada por conter inúmeros microrganismos (Fig. 13 I). No quarto e quinto nós o citoplasma das células secretoras já se encontrava degradado, com organelas não distinguíveis (Fig. 13 J - L). O núcleo quando observado apresenta-se disforme e com envoltório nuclear rompido (Fig. 13 J). Nestes nós também foram observados microrganismos ocupando o citoplasma (Fig. 13 K, L).

Em *P. rudgeoides* foi possível acompanhar uma gradativa mudança das características ultraestruturais dos coléteres nos subsequentes nós e observar seu processo de senescência. No entanto para confirmação do tipo de morte celular pela

qual passa as células dos coléteres desta espécie foi necessária a realização do teste TUNEL, a fim de verificarmos se as células estavam vivas ou mortas durante a degradação citoplasmática.

O teste TUNEL positivo para os coléteres do primeiro nó mostrou que estes já apresentavam DNA bastante fragmentado (Fig. 14 A-C), e os testes TUNEL negativos para os coléteres do segundo nó em diante, mostraram que o DNA já se encontrava totalmente degradado nestes nós (Fig. 14 D-L).

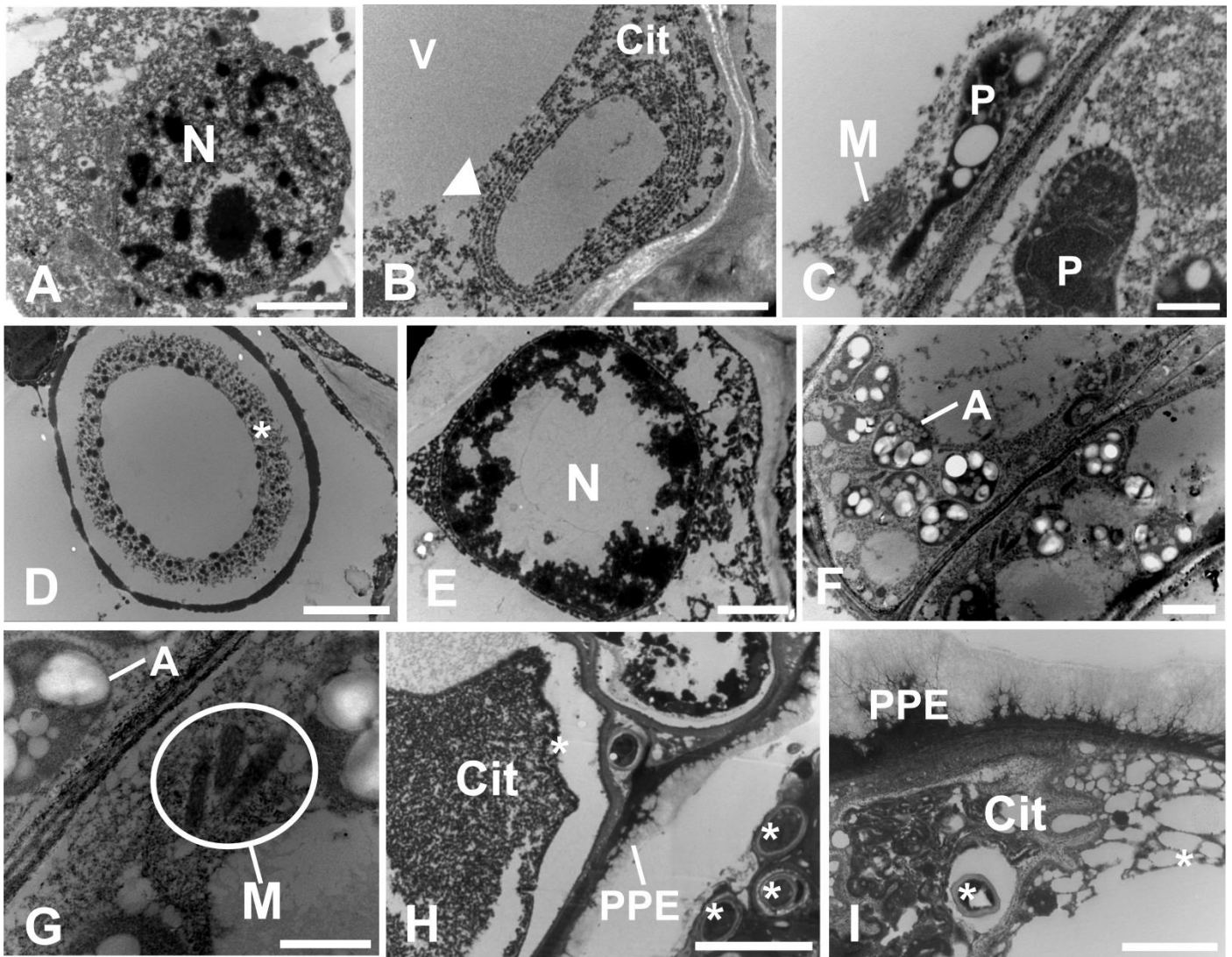


Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão das células secretoras dos coléteres de *P. tetraphylla*. Células secretoras de coléteres do primeiro nó com: núcleo conspicuo (A) grande vacúolo e retículo endoplasmático rugoso (ponta de seta) (B) plastídios, mitocôndrias (C) microorganismo (D). E Célula secretora do segundo nó apresentando núcleo com cromatina condensada com distribuição irregular e envelope estruturalmente alterado F Célula secretora do terceiro nó com acúmulo de amiloplastos e diversas mitocôndrias. G detalhe da micrografia F. H, I Células secretoras do segundo e terceiro nós respectivamente com microrganismos (*) em seu interior e citoplasma totalmente degradado. A= amiloplasto, Cit= citoplasma, M= mitocôndria, N = núcleo, P= plastídio, PPE= parede periclinal externa V= vacúolo. Barras: A, B, E, F, I 2 μ m; C 500nm; D, G 1 μ m; H 5 μ m.

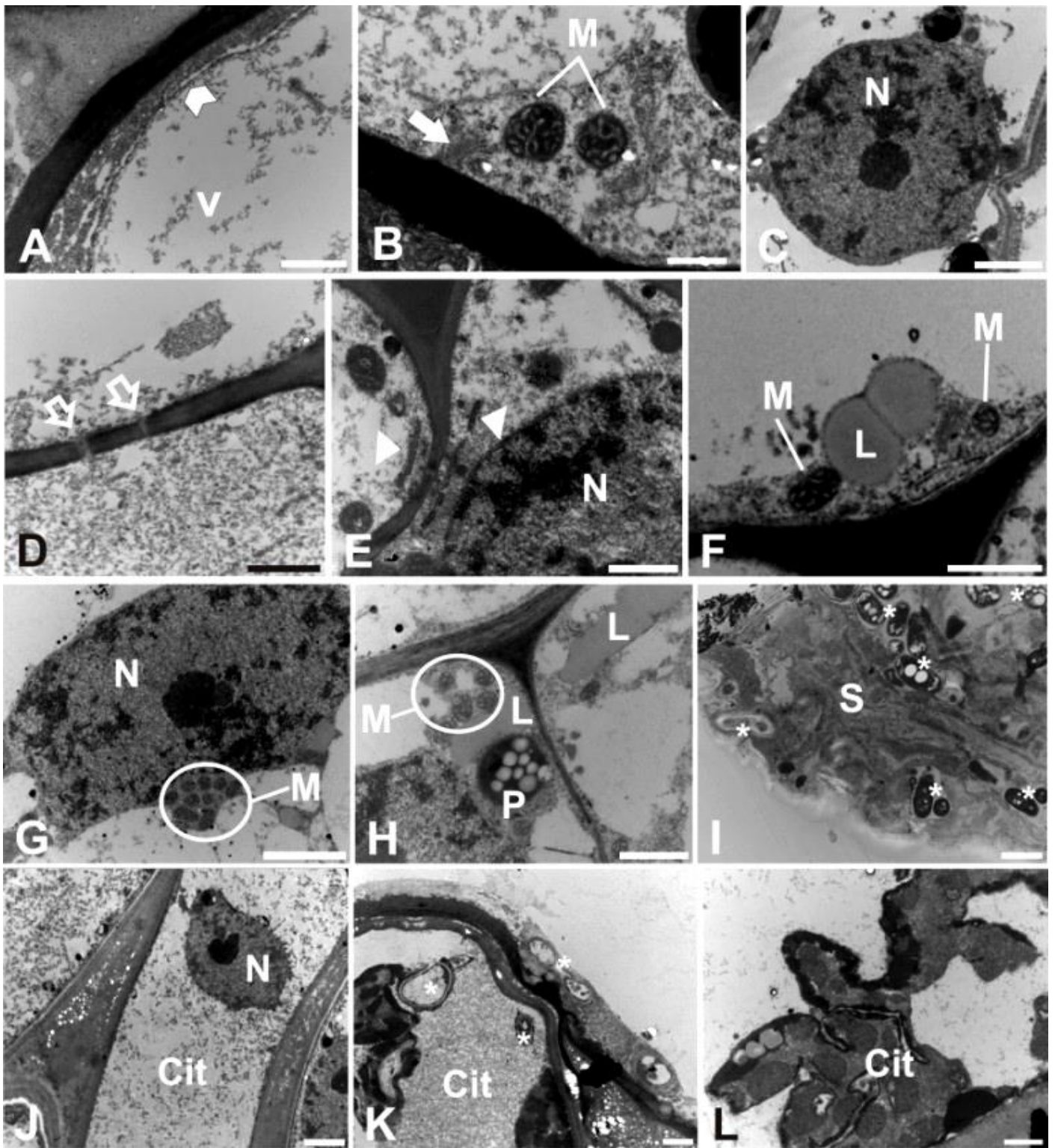


Figura 13: Microscopia eletrônica de transmissão das células secretoras dos coléteres de *P. rudgeoides*. Células secretoras de coléteres do primeiro nó com: citoplasma periférico e vacúolo com membrana íntegra (ponta de flecha) (A) complexo de Golgi pouco desenvolvido (seta cheia) e mitocôndrias (B) núcleo conspicuo (C) plasmodesmas (seta vazia) (D). Células secretoras do segundo nó com elementos do retículo endoplasmático rugoso (E) mitocôndrias e gotas lipídicas (F) mitocôndrias agrupadas na periferia nuclear (G). H célula secretora do terceiro nó com plastídios, gotas lipídicas e mitocôndrias agrupadas no citoplasma I Secreção com inúmeros microrganismos (*) J Célula secretora do quarto nó com citoplasma degradado e núcleo disforme com envoltório rompido K, L Células secretoras do quarto e quinto nós respectivamente com microrganismos (*) em seu interior e citoplasma totalmente degradado. Cit= citoplasma, L = gota lipídica, M= mitocôndria, N = núcleo, P= plastídeo S= secreção Barras: A, D, E, F, H, I, K, L 1µm; B 500nm; C, G 2 µm; J 2,5 µm.

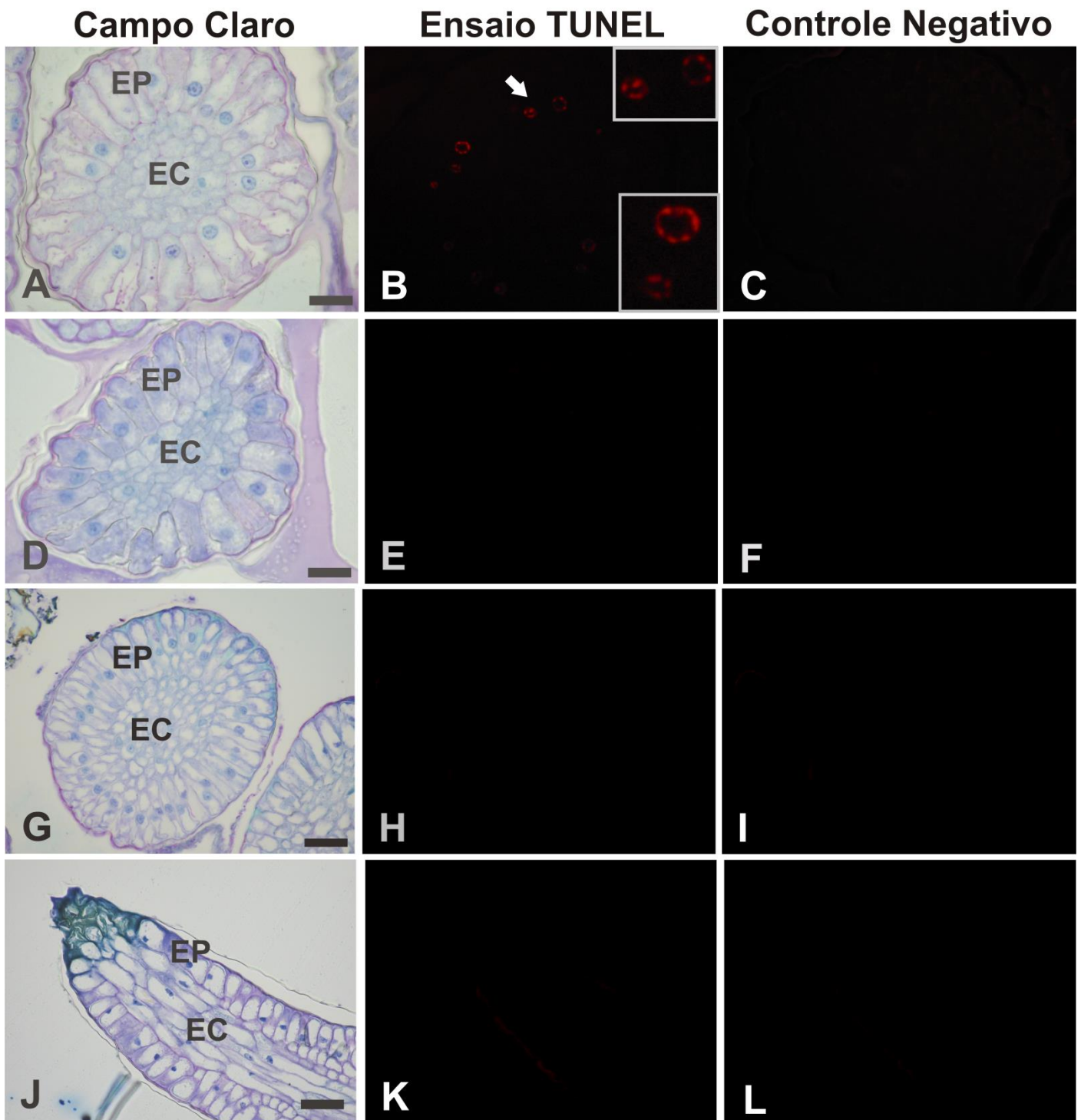


Figura 14: Microscopia óptica dos coléters de *P. rudgeoides*. Ensaio TUNEL. **A, B, C** Coléter do primeiro nó em campo claro, ensaio TUNEL e controle negativo respectivamente, mostrando núcleos TUNEL positivos em **B**. **D, E, F** Coléter do segundo nó em campo claro, ensaio TUNEL e controle negativo respectivamente, mostrando núcleos TUNEL negativos em **E, F**. **G, H** Coléter do terceiro nó em campo claro, ensaio TUNEL e controle negativo respectivamente, mostrando núcleos TUNEL negativos em **H**. **J, K, L** Coléter do quarto nó em campo claro, ensaio TUNEL e controle negativo respectivamente, mostrando núcleos TUNEL negativos em **K**. Ep= Epiderme, Ec= Eixo central Barras: **A-F** - 20µm, **J-L** - 50µm.

7. Discussão

P. rudgeoides e *P. tetraphylla* apresentam coléteres na superfície adaxial das estípulas, conforme observado na maioria das espécies de Rubiaceae (Robbrecht 1978, 1983; Dave *et al.* 1988) como já reportado para espécies do gênero *Simira* (Klein *et al.* 2004), *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Barreiro & Machado 2007), para espécies do gênero *Bathysa* (Miguel *et al.* 2010), *Palicourea rigida* Kunth, *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Leite 2012), *Alseis pickelii* (Tullii *et al.* 2013) e para o gênero *Psychotria* (Miguel *et al.* 2010; Vitarelii & Santos 2009; Trindade 2013). Os coléteres das espécies estudadas estão distribuídos em forma de triângulo na base das estípulas. Esta distribuição já foi encontrada na família (Klein *et al.* 2004; Tullii *et al.* 2013). No entanto, este é um carácter variável. Por exemplo, nas espécies *Simira pikia* K. Schum., *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltdl. e *Psychotria suterella* Muell. Arg. os coléteres se encontram distribuídos em uma linha na base da estípula (Klein *et al.* 2004; Trindade 2013); em *Simira rubra* Mart. se distribuem em diversas linhas; em *Psychotria carthagenensis* Jacq. formam uma linha na vertical; e em *Psychotria ruellifolia* Cham. & Schltdl. e *Psychotria capitata* Ruiz & Pav., os coléteres formam um pequeno grupo na base da estípula (Trindade 2013). Estas variações podem ser utilizadas como uma característica taxonômica em nível de espécie.

Em relação à morfologia, os coléteres também apresentam variações, sendo estas importantes para a sistemática da família Rubiaceae. Lersten (1974 *a, b*) descreveu seis tipos de coléteres em Rubiaceae com base na aparência da sua epiderme: “standard” (padrão), “intermediate” (intermediário), “dendroid” (dendróide), “brushsímile” (tipo escova), “reduced” (reduzido), “irregular epidermal cells” (epiderme irregular). O tipo padrão é o mais comum, a partir do qual as outras formas parecem derivar (Lersten 1974b).

Os coléteres das espécies estudadas possuem epiderme secretora em paliçada e eixo central parenquimático, assim como descrito por Thomas (1991) e Da Cunha & Vieira (2005) e se encaixam anatomicamente no tipo padrão, o que corrobora com os resultados encontrados para diversas espécies da mesma família (Lersten 1974a; Thomas & Dave 1990; Klein *et al.* 2004; Miguel *et al.* 2006; Vitarelii & Santos 2009; Trindade 2013). Ademais, na morfologia, o coléter padrão esquematizado por Lersten (1974a) possui a porção medial ligeiramente mais larga que o ápice e a base. Os coléteres aqui descritos são caracterizados por serem mais cilíndricos, sendo então

denominados de cilindríformes, nomenclatura já adotada por Da Cunha (2005), Tullii *et al.* (2013) e Trindade (2013).

A presença do eixo central formado por células parenquimáticas encontrado em *P. tetraphylla* e *P. rudgeoides* sugere que esses coléteres possuam uma origem mista, a partir da protoderme e do meristema fundamental. Este fato permite concluir que, para esta espécie, os coléteres não devem ser considerados tricomas, como definido por Solereder (1908), Lersten & Horner (1968) e Fahn (1979), mas sim como emergências, terminologia discutida por Rio *et al.* (2002), Paiva & Machado (2006) e Klein *et al.* (2004). Entretanto, esta característica não é universal para o gênero *Palicourea*. Leite (2012) descreveu coléteres constituídos somente por epiderme secretora e que estão diretamente situados sobre a estípula em *P. rigida*. A autora salienta em seu trabalho que estes coléteres não possuem a complexidade das emergências, pois não possuem parênquima distinto. Tampouco constituem tricomas e propõe que os mesmos sejam uma redução do coléter, constituindo uma condição derivada. No entanto, a hipótese necessita de mais estudos.

Os coléteres aqui estudados apresentaram vascularização e cristais em seu eixo central. Tecido vascular não é reportado com frequência em coléteres (Woodson & Moore 1938) e a presença de vascularização também pode variar entre os diferentes coléteres de órgãos vegetativos de uma mesma planta, como ocorre em *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae) (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002). Os autores supracitados inferem que a presença de vascularização nessas estruturas secretoras está relacionada com a proximidade com os traços vasculares do órgão em que se encontram, e que ausência de vascularização parece não influenciar na função secretora dos coléteres. No entanto, Leite (2012) propõe que a presença de vascularização possa facilitar a distribuição de materiais precursores da secreção até as células epidérmicas.

A presença de cristais no eixo central das espécies estudadas está em consonância com frequentes relatos para coléteres de diversas espécies de Rubiaceae, particularmente para subfamília Rubioideae, onde cristais de ráfides são apontados como uma característica típica (Lersten 1974a; Thomas 1991) sendo estes encontrados nas duas espécies estudadas. Além disso, cristais estilóides também foram observados em *P. tetraphylla*, ocupando o mesmo tecido, sendo esta informação relevante em agrupamentos sistemáticos. Uma função comumente associada aos cristais é a defesa contra herbivoria relacionada às suas propriedades físicas, como por exemplo, o

formato, podendo conferir impalatabilidade aos tecidos que os contêm (Ward *et al.* 1997; Hudgins *et al.* 2003; Franceschi & Nakata 2005; Korth *et al.* 2006). Outra função geralmente relatada é relação dos cristais com o metabolismo e equilíbrio iônico do cálcio e também com a remoção de acúmulos tóxicos de oxalatos (Dickison 2000).

A ausência de poros, canais ou rompimento da cutícula não nos permitiu esclarecer o modo secretor dos coléteres das espécies estudadas. No entanto, vários indícios sobre esse processo foram observados nas micrografias. Protuberâncias de diversos tamanhos na parede dos coléteres de *P. tetraphylla* e grandes abaulamentos na superfície dos coléteres de *P. rudgeoides*, somadas ao acúmulo de secreção nos espaços intercelulares das duas espécies, no espaço subcuticular de *P. rudgeoides* e nos estratos cuticulares das duas espécies levam-nos a supor que o processo secretor ocorra através da parede como resultado da pressão exercida pelo acúmulo de secreção (Mohan & Inandar 1986; Paiva *et al.* 2001). Paiva (2009) ressalta que o acúmulo dos produtos de secreção entre a parede e a cutícula parece promover a pressão que permite o fluxo de secreção atravessar a barreira cuticular, provavelmente por rupturas. Assim, a secreção poderia ser liberada sem requisitos de energia. No entanto Miguel *et al.* (2006) e Trindade (2013) sugerem que a secreção passaria pela parede celular através de desorganização de suas camadas. No entanto, nas espécies estudadas são necessários mais estudos para esclarecer o processo secretor.

A secreção dos coléteres pode ter uma composição complexa, no entanto o caráter mucilaginoso é frequentemente reportado. Os coléteres das espécies estudadas produzem secreção rica em mucopolissacarídeos ácidos, evidenciados pela marcação com o vermelho de rutênio, e proteínas, evidenciadas pela marcação com o azul de Coomassie. Lipídios não foram detectados. Apesar da presença de mucopolissacarídeos ácidos, a secreção ao ser corada com azul de toluidina adquiriu coloração azul/arroxeadada, evidenciando seu caráter básico. Este resultado pode ser explicado pelo fato da metacromasia não estar ligada a nenhum grupo químico particular, mas ser dependente, unicamente, da presença de elevada densidade de cargas negativas, alinhadas e espaçadas regularmente à superfície das substâncias às quais se ligam o corante.

A composição mucilaginosa da secreção é muito importante para a função de proteção contra a dessecação em células vegetais (Gregory & Bass 1989). A redução da transpiração ocorre devido à formação de uma malha, ou camada gelatinosa, que o vapor de água deve atravessar antes de alcançar o meio externo (Gregory & Bass 1989).

Outra função que pode ser atribuída aos polissacarídeos presentes na secreção dos coléteres está relacionada à proteção contra patógenos. Já foi constatado que polissacarídeos pécticos da parede celular vegetal, quando hidrolisados pela ação de enzimas dos patógenos, liberam oligossacarídeos que, por sua vez, induzem à síntese de fitoalexinas, as quais atuam na resposta da planta à infecção (Silva & Braga 2004).

A presença de proteínas na secreção de coléteres também já foi detectada por diversos autores. Estudos como o de Vieira *et al.* (2006) e Miguel *et al.* (2006) ressaltam a importância dessas moléculas na defesa vegetal. No entanto, o assunto carece de estudos mais aprofundados.

A detecção de compostos fenólicos no tecido foi evidenciada somente em coléteres senescentes de *P. tetraphylla* e o acúmulo de ácidos graxos no tecido senescente foi evidenciado nos coléteres das duas espécies avaliadas. O aumento no teor de ácidos graxos livres já foi preconizado como indicador de senescência, associado à formação de superóxidos e radicais hidroxilas (Borges *et al.* 1992).

A senescência dos coléteres das espécies estudadas também foi acompanhada por mudanças nos caracteres anatômicos, ultraestruturais e bioquímicos e estes diferiram entre as espécies. Em *P. tetraphylla* o mesmo nó de estípula apresentava coléteres jovens e senescentes evidenciados em primeira instância pela diferença na sua coloração. Os jovens apresentam-se amarelados e a senescência foi ocorrendo de maneira basipetalar até a estrutura ficar completamente marrom ou enegrecida. Em *P. rudgeoides*, os nós de estípulas apresentavam coléteres que aparentavam estar no mesmo estágio, ou seja, estípulas mais jovens apresentavam somente coléteres jovens e no decorrer dos nós ocorria gradativamente a senescência, também evidenciada primeiramente pela mudança na coloração. Esta sequência de mudança de coloração relacionada à senescência dos coléteres foi igualmente encontrada em outras espécies (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas & Dave 1989b; Subramanian *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005; Tullii *et al.* 2013).

Geralmente as células secretoras apresentam citoplasma denso, com abundância de mitocôndrias e pequenos vacúolos, sendo que a frequência de outras organelas varia de acordo com o material secretado (Fahn 1988). Em *P. tetraphylla*, coléteres jovens denotavam turgidez e epiderme e parênquima com aparência íntegra. No entanto, na ultraestrutura foi possível observar que um mesmo coléter possuía células íntegras e outras com citoplasma completamente degradado. Isto porque diversas células

apresentavam bactérias em seu interior, o que provavelmente levou a degradação citoplasmática. Mas excetuando-se estas células, as características observadas em coléteres jovens foram citoplasma periférico com grande vacúolo, núcleo conspícuo com envoltório íntegro, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e muitos plastídios. Em relação às células secretoras de coléteres jovens as diferenças encontradas em *P. rudgeoides* foram a presença de complexo de Golgi pouco desenvolvido, plasmodesmas, gotas lipídicas no citoplasma e inúmeras mitocôndrias agrupadas na periferia nuclear.

O fato das células dos coléteres estudados possuírem citoplasma periférico com grande vacúolo difere do que é frequentemente relatado e pode ser simplesmente uma característica das espécies ou um resultado do aumento e posterior fusão de pequenos vacúolos que existiam num estágio mais inicial do desenvolvimento e que não puderam ser observados pelo fato de ocorrer muito precocemente nessas estruturas secretoras. Entretanto, é pouco provável que essa característica inicial não tenha sido observada em nenhuma amostra para as duas espécies. Além disso, o fato do complexo de Golgi ser pouco desenvolvido nas células secretoras de *P. rudgeoides* vai de encontro ao constante relato desta organela se apresentar hipertrófica em coléteres. A mesma organela não foi observada nas células secretoras de *P. tetraphylla* nos levando a crer que é pouco abundante nos coléteres da espécie, sendo isto um fato intrigante, pois a abundância de complexo de Golgi na fase secretora de coléteres foi descrita por diversos autores (Mohan & Inamdar 1986; Klein *et al.* 2004; Barreiro 2006; Tullii *et al.* 2013) e estudos mostram a importância dessa organela na produção de mucilagem e proteínas (Dexheimer & Guenin 1981) que são compostos encontrados na secreção dos coléteres estudados.

Os plasmodesmas observados nos coléteres de *P. rudgeoides*, podem ter relação com a otimização da condução dos produtos de secreção entre as células através das conexões simplásticas.

O agrupamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso perto do núcleo foi uma característica notável no citoplasma das células de *P. rudgeoides*. Estudos sobre a ultraestrutura de coléteres ressaltam a presença de grande quantidade de retículo endoplasmático, com localização perinuclear (Dexheimer & Guenin 1981). Esta localização está intimamente relacionada ao papel do retículo na síntese protéica e o agrupamento de mitocôndrias na mesma região acredita-se justificar-se pelo alto aporte de energia requerido na produção de proteínas, que no caso dos coléteres estudados,

fazem parte do produto secretado.

Os coléteres senescentes de *P. tetraphylla* apresentaram superfície enrugada, epiderme e parênquima degradados. Frequentemente as células senescentes apresentaram núcleo com cromatina condensada com distribuição irregular e envelope estruturalmente alterado caracterizando morte celular, mas que, no entanto, continham mitocôndrias e amiloplastos aparentemente íntegros. Outras células, porém, apresentavam degradação citoplasmática total e microrganismos em seu interior. Estas características divergentes entre as células de um mesmo coléter dificultaram a caracterização do processo de senescência nos coléteres dessa espécie e a elucidação do tipo de morte celular programada sofrida por estas células.

Em *P. rudgeoides*, os coléteres senescentes também apresentaram superfície enrugada, desorganização das células secretoras e parenquimáticas e degradação citoplasmática. Essas características foram evidentes nos coléteres do quarto e quinto nós. Até o terceiro nó, as células aparentavam ter núcleo morfologicamente íntegro. No entanto, através do ensaio TUNEL, observamos que ainda no primeiro nó o DNA nuclear se encontrava fragmentado e que nos nós subsequentes já tinha sido degradado. Estas características também indicam que as células secretoras dos coléteres de *P. rudgeoides* sofrem morte celular programada não-autolítica pelo fato da célula morrer precocemente, antes mesmo do início da degradação citoplasmática. Tullii *et al.* (2013) caracterizaram o mesmo tipo de morte celular programada em coléteres de *A. pickelii*. A fragmentação do DNA nuclear também foi detectada desde o primeiro nó de estípulas com gradativa diminuição da marcação do teste TUNEL nos nós subsequentes e as características ultraestruturais incluíam a retração do citoplasma, que não era periférico como nas espécies estudadas, e posterior degradação das organelas.

Nos coléteres de *P. rudgeoides*, por vezes, também observamos microrganismos ocupando o citoplasma, sendo que para esta espécie, a característica foi exclusiva para coléteres senescentes. Microrganismos são frequentemente reportados na secreção dos coléteres, principalmente em plantas encontradas em ambientes com uma microbiota tão rica como a Mata Atlântica. No entanto, para as espécies estudadas esses microrganismos foram detectados também dentro das células secretoras, inclusive em coléteres jovens na espécie *P. tetraphylla*. Este fato serviu para despertar nosso interesse e buscar elucidar esta relação, a qual será abordada no segundo capítulo.

8. Conclusões

Os coléteres encontrados na base da superfície adaxial de *P. tetraphylla* e *P. rudgeoides* são caracterizados anatomicamente por uma epiderme secretora disposta em paliçada e eixo central parenquimático vascularizado e rico em cristais. Estas estruturas secretoras são classificadas anatomicamente como tipo padrão, porém morfológicamente como cilíndricas.

A secreção de *P. tetraphylla* é abundante e possui aparência leitosa, já em *P. rudgeoides* a secreção é mais escassa e hialina. Apesar da diferença aparente, os testes histoquímicos mostraram que ambas as secreções são mucilaginosas, apresentam caráter básico, presença de proteínas, ausência de lipídios e servem de habitat para muitos microrganismos.

Através das análises anatômicas e ultraestruturais foi possível identificar dois estágios de desenvolvimento dos coléteres, uma fase jovem e outra fase senescente. Em *P. rudgeoides* confirmou-se que as células secretoras dos coléteres sofrem morte celular programada do tipo não-autolítica.

O mecanismo pelo qual a secreção deixa as células epidérmicas secretoras dos coléteres não foi elucidado, no entanto, sugere-se que o processo ocorra devido à pressão exercida pelo acúmulo de secreção observado. Estudos suplementares que investiguem o modo pelo qual as secreções alcançam o meio externo, bem como experiências que testem as funções que lhes são atribuídas, são necessários para o integral conhecimento dessas estruturas secretoras.

Capítulo 2

Coléteres estipulares em *Palicourea tetraphylla* Cham. & Schldl.
(Rubiaceae): perfil proteico e ação antifúngica da secreção e caracterização
de bactérias associadas

9. Introdução

Coléteres são estruturas secretoras que exsudam materiais de natureza complexa tipificados pela abundância de polissacarídeos mucilaginosos que possuem propriedades físicas relacionadas com a retenção de água (Thomas & Dave 1980; Inamdar *et al.* 1986; Mohan & Inamdar 1986; Rio *et al.* 2002; Mauseth 1988; Gregory & Bass 1989). Esta característica ressalta a função mais reportada dos coléteres que é o aumento da proteção dos tecidos meristemáticos e de órgãos em desenvolvimento, lubrificando-os e evitando que sofram com a dessecação. No entanto, outras funções foram sugeridas para estruturas secretoras como, defesa contra herbivoria, ação de patógenos (Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a; Thomas & Dave 1989b; Thomas 1991; Demarco 2005) e adaptação ambiental (Sheue & Yang 2012).

Descrições anatômicas e estudos histoquímicos sobre coléteres fundamentam a maior parte do conhecimento sobre estas estruturas, mas poucos trabalhos se voltaram para o delineamento de experimentos que analisassem suas diversas funções. Quatro exceções são encontradas nos seguintes trabalhos: Miguel *et al.* (2006) e Leite (2012) constataram que as secreções dos coléteres de *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae), *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae) e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. Rubiaceae inibem o crescimento de esporos fúngicos; no ensaio realizado por Curtis & Lersten (1974) em *Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall (Salicaceae), onde os autores observaram que as larvas do inseto *Chrysomela scripta* Fabricius (Coleoptera) evitavam folhas cobertas pela secreção resinosa de coléteres (abordados como glândulas pelos autores); e no estudo realizado por Sheue *et al.* (2013) que relacionou a morfologia, anatomia e secreção dos coléteres de diversas espécies da família Rhizophoraceae à adaptação ao ambiente de manguezal.

Sendo assim, os objetivos específicos deste trabalho foram: analisar o perfil proteico da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* e sua ação antifúngica; isolar e caracterizar bactérias associadas a esta secreção buscando elucidar a relação destes microrganismos com a ecologia da espécie em questão.

10. Materiais e métodos

10.1. Material Botânico

No Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ) foram coletados 50 ápices caulinares de diversos indivíduos de *P. tetraphylla*, o material levado fresco para o processamento no laboratório. Como controle, para avaliar a presença de microrganismos em outros tecidos vegetais, 10 folhas frescas de diferentes indivíduos da mesma espécie também foram coletadas.

10.2. Extração e dosagem das proteínas

Para extração de proteínas totais da secreção do coléter, os ápices foram lavados em tampão contendo Tris-HCl (pH 8,7) e Triton X-100 (0,1%) e imersos na mesma solução durante 5 minutos (Miguel *et al.* 2006). Em seguida, a solução resultante foi passada em papel filtro e dialisada a temperatura de 4°C, por dois dias (Klein *et. al* 2004).

Após a diálise, o material foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 90%. Posteriormente, o material foi centrifugado, e o sobrenadante descartado para obtenção do precipitado, que em seguida, foi solubilizado em água destilada, dialisado e liofilizado.

A dosagem de proteínas totais foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

10.3. Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

O extrato proteico total dos coléteres de *P. tetraphylla* foi submetido à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2/C18 acoplada a uma coluna guarda C8. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo de 0,5 ml.minutos⁻¹. Para a eluição das proteínas da coluna foi utilizado um gradiente de acetonitrila: 0-10 min, 100 % da solução A (TFA 0,1 % contendo acetonitrila 2 %); 10-80 minutos, 0-100 % da solução B (acetonitrila 80 % contendo TFA 0,1 %); 80-85 minutos, 100 % da solução B; 85-90 minutos, 100-0 % da solução B; e 90-95 minutos, 100 % da solução A. A eluição dos peptídeos foi acompanhada por um detector do tipo DAD, a uma absorbância de 200 nm.

10.4. Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

O processo de purificação de peptídeos dos coléteres de *P. tetraphylla* foi realizado pelo método de eletroforese em gel de tricina descrito por Schagger e Von Jagow (1987), em sistema Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad).

Para acompanhar a massa molecular relativa dos peptídeos foi utilizado um marcador de peptídeos de baixas massas moleculares.

Após a eletroforese, o gel foi submerso em uma solução corante de Coomassie Blue R (Coomassie Blue 0,5%, ácido acético 70% e metanol 40% em água destilada) durante 30 minutos. Em seguida, o gel foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 10% e metanol 30% em água destilada) para que fosse possível a visualização das bandas protéicas. Posteriormente, o gel foi armazenado em água destilada.

10.5. Detecção da atividade antifúngica do extrato proteico total da secreção

Para o ensaio da atividade antifúngica do extrato proteico total da secreção foi seguido o protocolo desenvolvido por Broekaert *et al.* (1990), com adaptações. Em suma, repiques de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum* foram retirados de culturas mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (UENF) e inoculados em placas de Petri contendo o meio ágar Saboraud. Após o crescimento das culturas, 10 ml de solução salina estéril (0,15 M) foram vertidos sobre as placas de Petri e para a liberação dos esporos do fungo filamentosos e das células das leveduras foi utilizada uma alça de Drigalski. Os esporos e as células extraídas foram quantificados em câmara de Neubauer. O material quantificado foi inoculado em meios líquidos contendo 50 µg/ml e 100 µg/ml do extrato proteico total da secreção. Para determinar o crescimento dos microrganismos, leituras ópticas foram realizadas em um espectrofotômetro a 620 nm, no tempo zero e a cada 6h, por um período de 24h para as leveduras e 36h para o fungo filamentosos. Para o controle, o ensaio foi realizado sem adição do extrato proteico total da secreção. Todo o ensaio foi conduzido em condições estéreis em capela de fluxo laminar e realizado em triplicata.

10.6. Análise da morfologia das células e esporos fúngicos

Para analisar a morfologia das células e esporos fúngicos após o ensaio da atividade antifúngica do extrato proteico total da secreção o material foi observado sob microscopia eletrônica de varredura. Através da adição de alíquotas dos meios de crescimento contendo os fungos e o extrato proteico total da secreção a uma solução aquosa composta de glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, o material foi fixado. O mesmo foi realizado com a amostra controle.

Após a fixação do material, o mesmo foi depositado sobre lamínulas cobertas com polilisina para que as células dos microrganismos ficassem retidas. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes, por 45 minutos, com tampão cacodilato de sódio 0,05 M e desidratadas em série cetônica: 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100 % por um período de uma hora em cada etapa. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (CPD 030 Bal-tec®). Posteriormente, as lamínulas contendo as células fixadas foram cobertas com fita adesiva de carbono, em suportes próprios (“stubs”), e sobreposta uma fina camada de ouro de 20 nm (SCD 050 Bal-tec®). A observação e as eletromicrografias foram obtidas com o uso do microscópio eletrônico de varredura (DSM 962 Zeiss®), a uma voltagem variando até 25 kV.

10.7. Ensaio de permeabilização da membrana citoplasmática fúngica

O material foi fixado como descrito anteriormente no tópico 10.6. Para a detecção da permeabilização da membrana citoplasmática, as amostras foram incubadas com SYTOX Green por 10 minutos antes de serem colocadas sobre a lâmina, e a observação foi feita no microscópio óptico (Axioplan Zeiss®), utilizando luz fluorescente na faixa de excitação de 450 a 490 nm e emissão máxima na faixa de 523 nm (Thevissen *et. al* 1999). As micrografias foram obtidas através da câmera Cannon Power Shot 14 mpixel (acoplada ao microscópio) com o auxílio do programa Axiovision (Zeiss).

O material também foi observado e registrado em campo claro, utilizando o mesmo microscópio e a mesma câmera.

10.8. Isolamento das bactérias presentes na secreção e nos coléteres de *P. tetraphylla*

Cerca de 50 Ápices caulinares de *P. tetraphylla* foram lavados com água destilada estéril para a retirada da secreção e esta foi armazenada a 4 °C. Posteriormente, as estípulas foram destacadas e os coléteres dissecados. Para a desinfestação superficial dos coléteres, estes foram imersos em etanol 90% por 60 segundos sob agitação e lavados 3 vezes por 3 minutos com água destilada estéril. Em seguida, os coléteres foram imersos em solução contendo hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos e lavados 3 vezes por 3 minutos com água destilada estéril.

Para o isolamento das bactérias foi utilizado o método das diluições seriadas. Para cada 0,1mg de secreção foram adicionados 90 ml de solução salina (0,85% de NaCl) e o material foi incubado a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 60 minutos. Em seguida, foram feitas diluições de 10^{-2} a 10^{-7} , tendo-se transferido sucessivamente 1 mL da suspensão, de cada diluição, para tubos com 9 mL de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100µL foram inoculadas em vidros de penicilina com meio semissólido seletivo para bactérias fixadoras de nitrogênio JNFB (Tabela 2) e LGI (Tabela 3) (Döbereiner *et al.* 1995) e incubados em estufa a 30 °C durante 7 dias. Após esse período, a avaliação da fixação biológica de nitrogênio foi realizada por meio da visualização ou não da película aerotóxica. Os microrganismos que cresceram neste meio foram transferidos para placas de Petri contendo o meio sólido DYGS (Tabela 4) (Baldani 1996). Para os coléteres o mesmo foi feito, no entanto eles foram macerados antes da diluição.

Alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas foram plaqueadas em meio sólido DYGS para o crescimento dos microrganismos não diazotróficos.

Tabela 2: Composição do meio de cultivo JNFB - pH 5,8

Componente	Concentração
Ácido Málico	5 (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,6 (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	1,8 (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 (g.L ⁻¹)

NaCl	0,1 (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 (g.L ⁻¹)
azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)	5 (mL)
FeEDTA (solução 1,64%)	4 (mL)
solução de vitaminas para meio de cultura	1 (mL)
Ágar	1,8 (g.L ⁻¹)

Tabela 3: Composição do meio de cultivo LGI - pH 6,0

Componente	Concentração
Sacarose	5 (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,2 (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,6 (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 (g.L ⁻¹)
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0,002 (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,002 (g.L ⁻¹)
azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)	5 (mL)
FeEDTA (solução 1,64%)	4 (mL)
solução de vitaminas para meio de cultura	1 (mL)
Ágar	1,8 (g.L ⁻¹)

Tabela 4: Composição do meio de cultivo DYGS sólido - pH 6,0

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	2,0
K ₂ HPO ₄	0,5

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	2,0
Peptona bacteriológica	1,5
Ácido Glutâmico	1,5
Ágar	15,0

10.9. Capacidade de solubilização de fósforo, manganês e zinco

Para testar a capacidade das bactérias solubilizarem fósforo, manganês e zinco, foi utilizado o método do halo translúcido, o qual se forma em torno das colônias bacterianas. Para tanto, as bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS (meio DYGS sólido sem adição de ágar) (Rodrigues Neto 1986) durante 24 h, a 30 °C, sob agitação de 100 rpm. Após o crescimento, alíquotas de 10 µL do inóculo bacteriano foram colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido basal (Verma *et al.* 2001), acrescido de fosfato de cálcio terciário (Ca₅(PO₄)₃OH) (g.L⁻¹:1.5) e óxido de manganês (MnO₂) (g.L⁻¹:1.0). Para a solubilização de zinco foi utilizado meio sólido DYGS, acrescido de óxido de zinco (ZnO) (g.L⁻¹: 0.5). Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C por 10 dias para verificar a solubilização de fósforo e zinco. Para a solubilização de manganês as placas foram incubadas a 30°C por 30 dias. Após esse período, foi possível selecionar as bactérias capazes de solubilizar macro e micronutrientes.

10.10. Caracterização Molecular

10.10.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi feita para todos os isolados bacterianos oriundos da secreção e dos coléteres a partir de células cultivadas em meio DYGS líquido (Rodrigues Neto 1986), utilizando o kit de extração *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% e quantificado em fotodocumentador.

10.10.2. Amplificação do gene 16S rRNA

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S rRNA via PCR (Reação da Cadeia da Polimerase), utilizando iniciadores universais para o domínio *Eubacteria* “forward” 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 1492R “reverse” (5'-TAC GGYTAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Pandey *et al.* 2005).

As reações foram realizadas em volume final de 50 µl contendo 20 pmols de oligonucleotídeos, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão da enzima, 2 U da enzima Taq DNA polimerase (FERMENTAS), 1,5 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti-96 well thermal cycler (Applied Biosystems). Após a amplificação, foram retirados 5 µl do produto de reação de PCR, para avaliação por eletroferese em gel de agarose 1,2% corado com Gel Red.

O restante dos produtos amplificados foi precipitado com a adição de 60µl de isopropanol 100% (MERCK) e 20µl de água ultrapura autoclavada, vortexado e incubado por 2 horas a -20 °C. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 25 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento, foram adicionados 200µl de etanol 70% (MERCK), centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em estufa a 40 °C. Posteriormente, o material foi ressuspensão em 45µl de água ultrapura.

10.10.3. Sequenciamento do gene 16S rRNA

O material ressuspensão foi utilizado para a preparação da reação de sequenciamento que foi enviado para a empresa ACTGene Análises Moleculares, utilizando os iniciadores 27F e 1492R.

As sequências obtidas foram comparadas pelo GenBank utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1997) para nucleotídeos, e confrontados contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

10.11. Processamento controle com as folhas de *P. tetraphylla*

Com o objetivo de observar uma possível interação bacteriana nas folhas de *P. tetraphylla* e relacionar esta interação com os microrganismos encontrados nos coléteres

e na secreção, realizamos um processamento controle com as folhas da espécie vegetal em questão.

As folhas foram dissecadas e separadas em primeiro nó (par de folhas que ainda estavam dentro da estípula), segundo e terceiro nós. Parte do material foi fixada e processada para microscopia óptica e eletrônica de varredura, assim como descrito nos itens 5.3.1. a 5.3.4. Outra parte sofreu os mesmos procedimentos de desinfestação, isolamento de microrganismos, detecção de capacidade de solubilização de minerais e caracterização molecular descritos nos itens 10.8 a 10.10.

11. Resultados

Detecção da atividade antifúngica e perfil proteico da secreção

A partir dos ápices frescos trazidos do campo a secreção foi coletada para a obtenção do extrato proteico total. Após a dosagem foram estabelecidas duas concentrações de proteínas para os ensaios antifúngicos, 50 e 100 µg/ml, que foram respectivamente chamadas de tratamentos 1 e 2.

Os ensaios antifúngicos com o extrato proteico total da secreção em *S. cerevisiae* revelaram uma inibição no crescimento de cerca de 20% com os dois tratamentos (Fig. 14). Em *F. oxysporum* a inibição do crescimento foi de aproximadamente 30% para os dois tratamentos (Fig. 15). Em relação a *C. albicans* o resultado foi mais expressivo, o tratamento 1 inibiu aproximadamente 40% e o tratamento 2 revelou uma inibição do crescimento de cerca de 70% (Fig. 16).

Os tratamentos também induziram permeabilização da membrana plasmática, nas três espécies de microrganismos, evidenciada pela marcação com o corante fluorescente SYTOX Green (Fig. 17).

Alterações morfológicas nas três espécies de fungos também foram observadas. Em *C. albicans*, detectamos aglomerações celulares (Fig. 18 B, C); em *S. cerevisiae*, diminuição no tamanho das células e aglomerações celulares com extravazamento de conteúdo (Fig. 18 E, F); e em *F. oxysporum* hifas com deformidades (Fig. 18 H, I).

A fim de investigarmos o conteúdo do extrato proteico da secreção o mesmo foi submetido à purificação por HPLC. Foram coletadas 13 frações e o perfil eletroforético das frações F2, F10, F12 e F13 revelaram a presença de um peptídeo em cada, com massa molecular em torno de 6kDA.

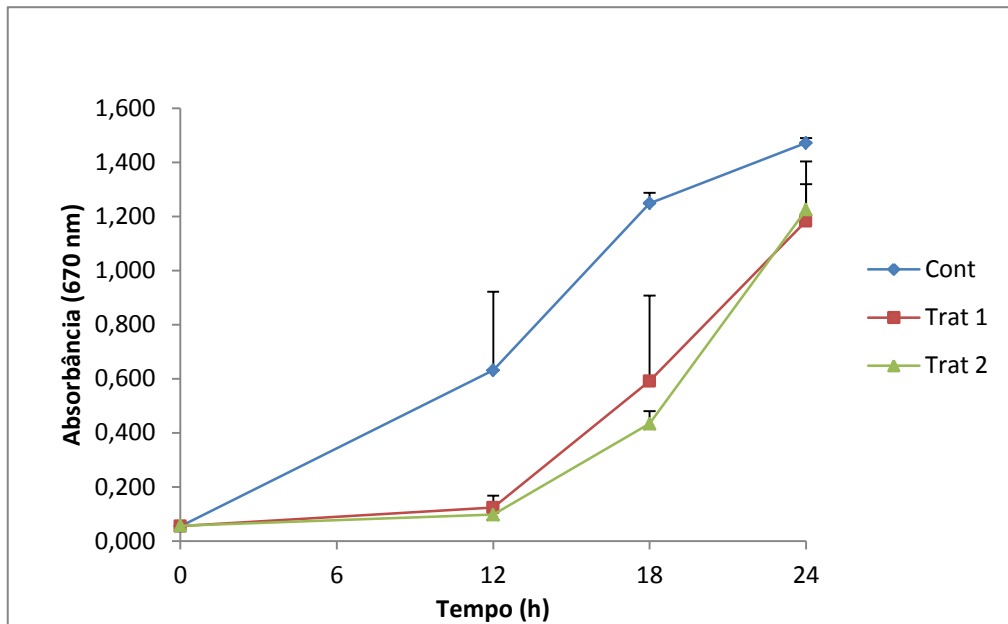


Figura 15: Ensaio de inibição do crescimento das células de *S. Cerevisiae* inoculadas com o extrato proteico total da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* durante 24h. **Trat 1** – células inoculadas em meio contendo 50 µg/ml de proteínas do extrato proteico total da secreção **Trat 2** – células inoculadas em meio contendo 100 µg/ml de proteínas do extrato proteico total da secreção **Cont** – células crescidas em meio livre do extrato proteico total da secreção.

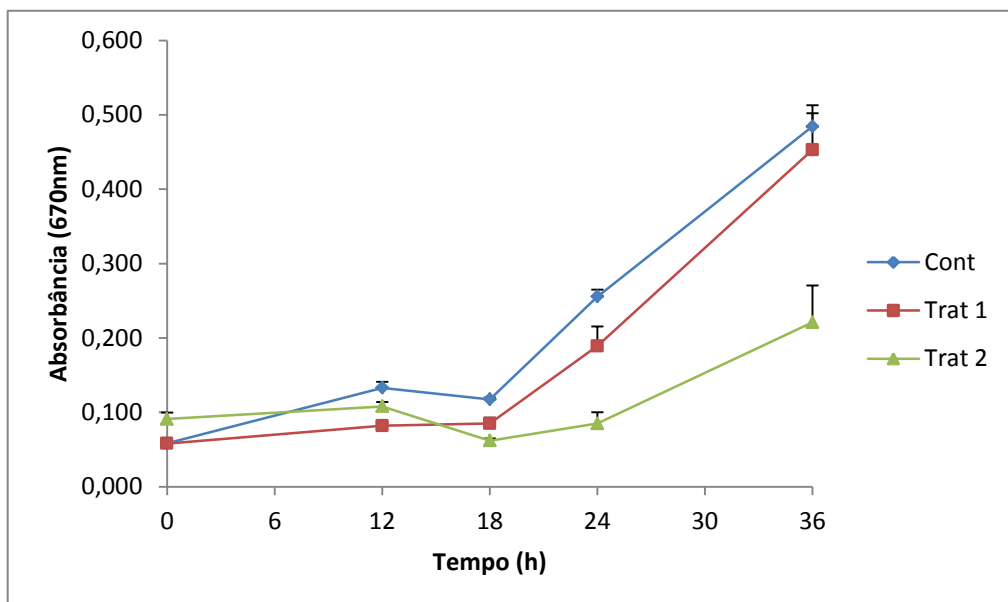


Figura 16: Ensaio de inibição do crescimento de esporos de *F. oxysporum* inoculados com extrato proteico total da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* durante 36h. **Trat 1** – esporos inoculados em meio contendo 50 µg/ml de proteínas do extrato proteico total da secreção **Trat 2** – esporos inoculados em meio contendo 100 µg/ml de proteínas do extrato proteico total da secreção **Cont** – esporos crescidos em meio livre do extrato proteico total da secreção.

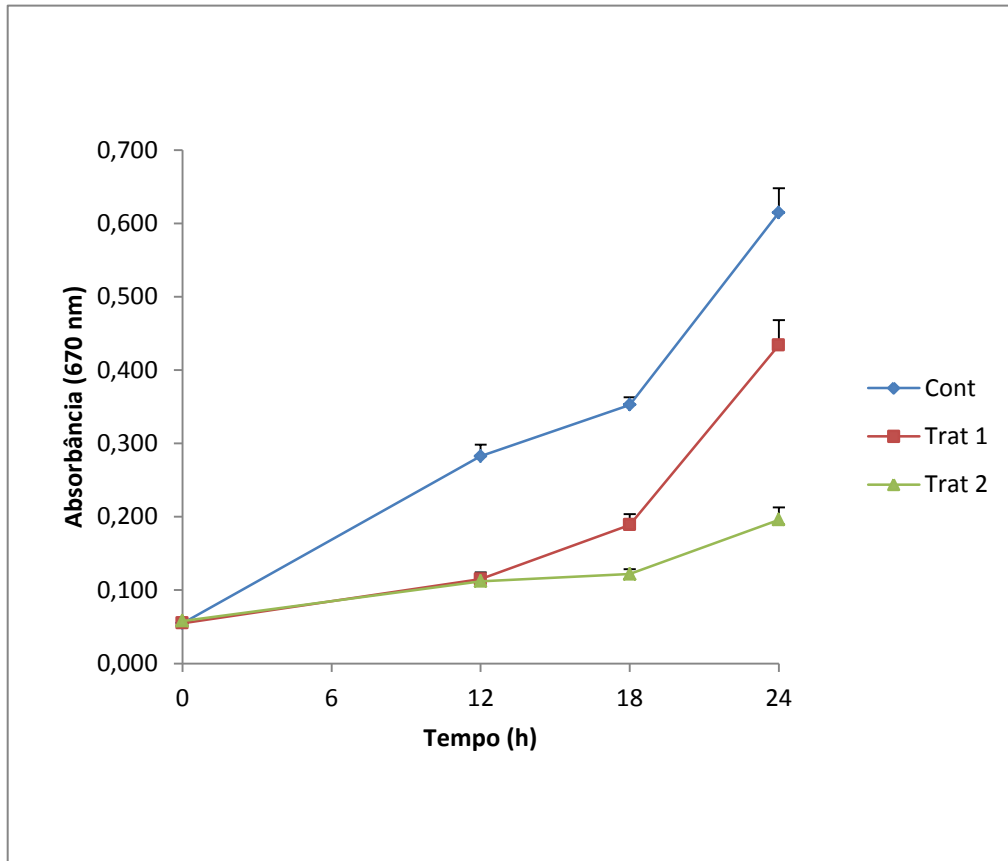


Figura 17: Ensaio de inibição do crescimento das células de *C. albicans* inoculadas com o extrato proteico total da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* durante 24h. **Trat 1** – células inoculadas em meio contendo 50 µg/ml de proteínas do extrato proteico total da secreção **Trat 2** – células inoculadas em meio contendo 100 µg/ml de proteínas do extrato proteico total da secreção **Cont** – células crescidas em meio livre do extrato proteico total da secreção.

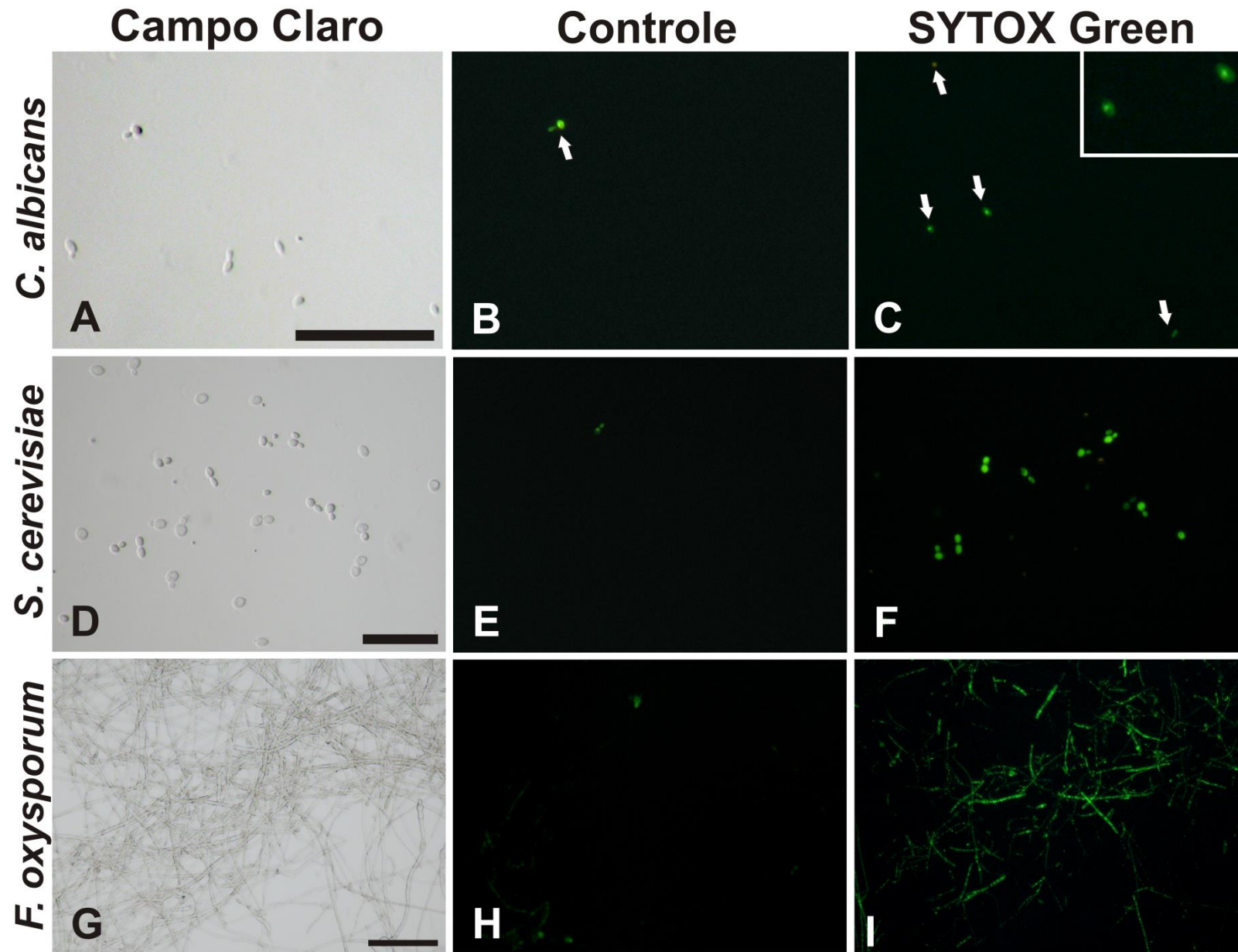


Figura 18: Microscopia de fluorescência mostrando a permeabilização da membrana em **A-C** *C. albicans* **D-F** *S. cerevisiae* **G-I** *F. oxysporum*. Controle: células incubadas com SYTOX Green. Tratamento: células tratadas com 100 µg/ml do extrato proteico total da secreção e incubadas com SYTOX Green. As setas ressaltam as marcações com SYTOX Green em *C. albicans* devido às células serem muito pequenas. Barras: **A-F** 50 µm **G-I** 100 µm.

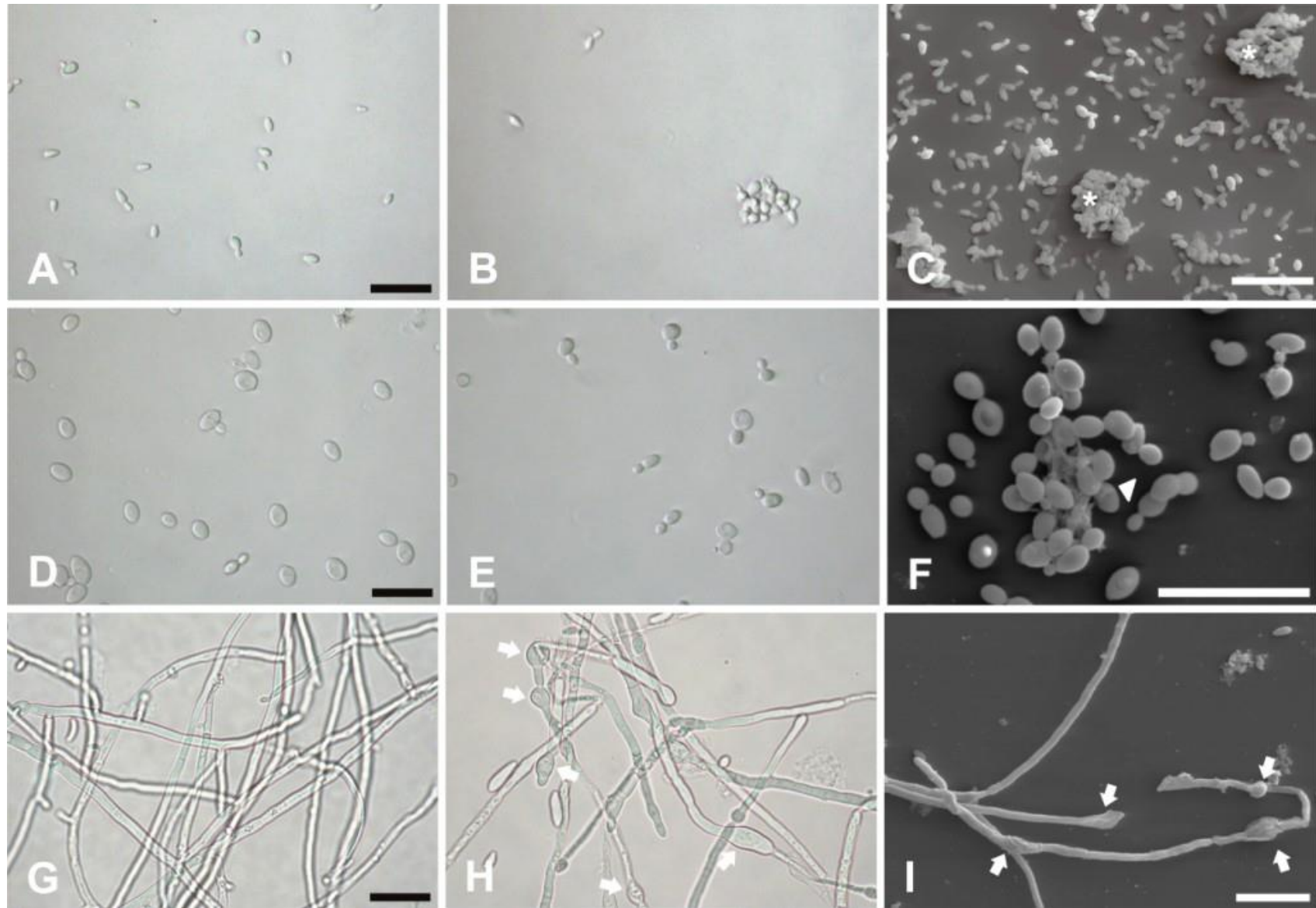


Figura 19: Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura mostrando alterações morfológicas nas três espécies de microrganismos tratadas com 100 µg/ml do extrato proteico total da secreção. **A-C** *C. albicans* **A** controle **B, C** células após o tratamento com aglomeração celular (*). **D-F** *S. cerevisiae* **D** controle **E, F** células após o tratamento mostrando diminuição no tamanho (**E**) e aglomeração com extravamento de conteúdo (ponta de seta) (**F**). **G-I** *F. oxysporum* **G** controle **H, I** hifas após o tratamento com alterações morfológicas (setas). Barras: 20 µm.

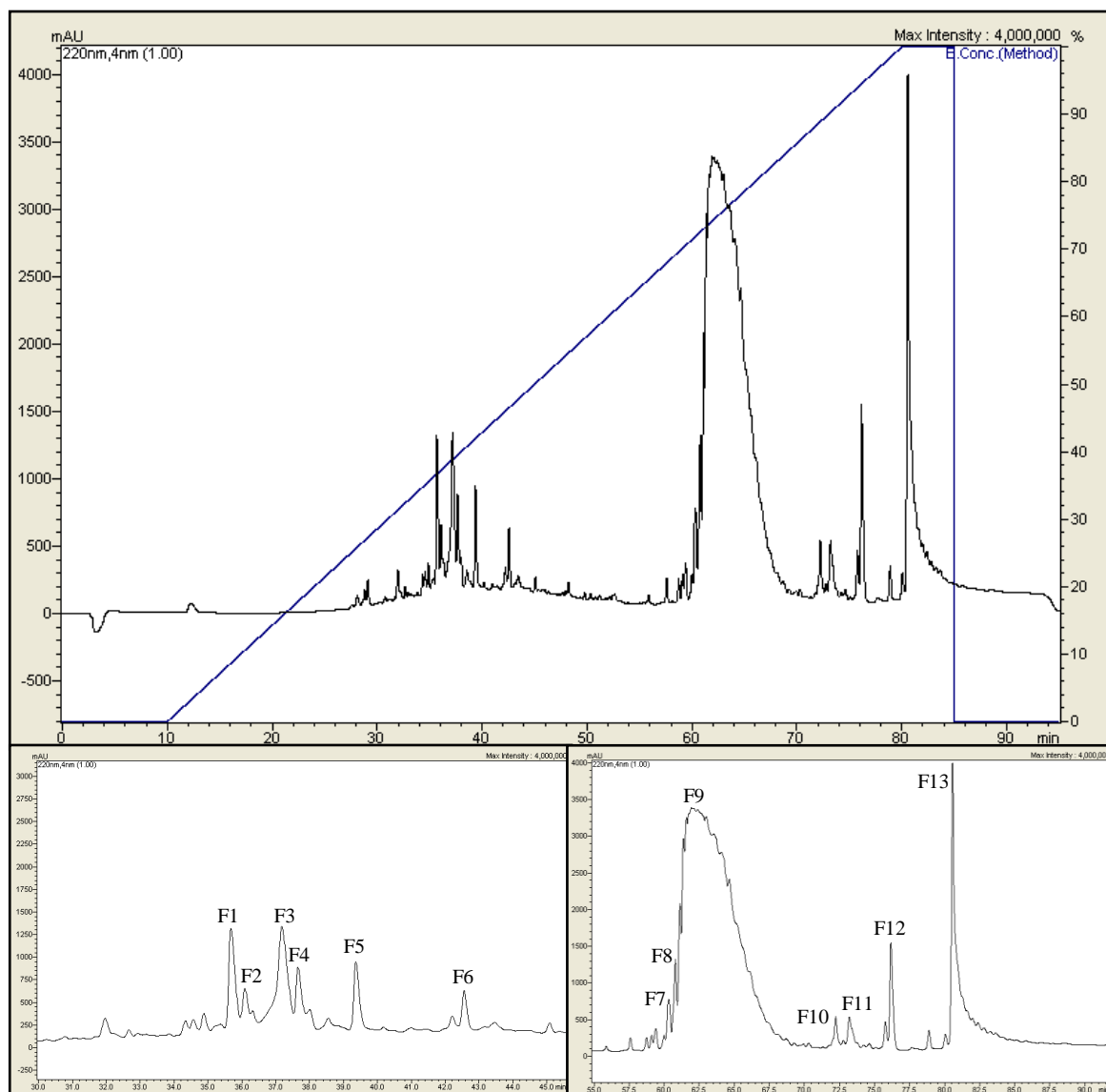


Figura 20: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do extrato proteico total dos coléteres de *P. tetraphylla*, utilizando coluna C2C18, com fluxo de 0,5mL/min. Fase móvel A – TFA 0,1 % contendo ACN 2 %, B – ACN 80 % contendo TFA 0,1 %.

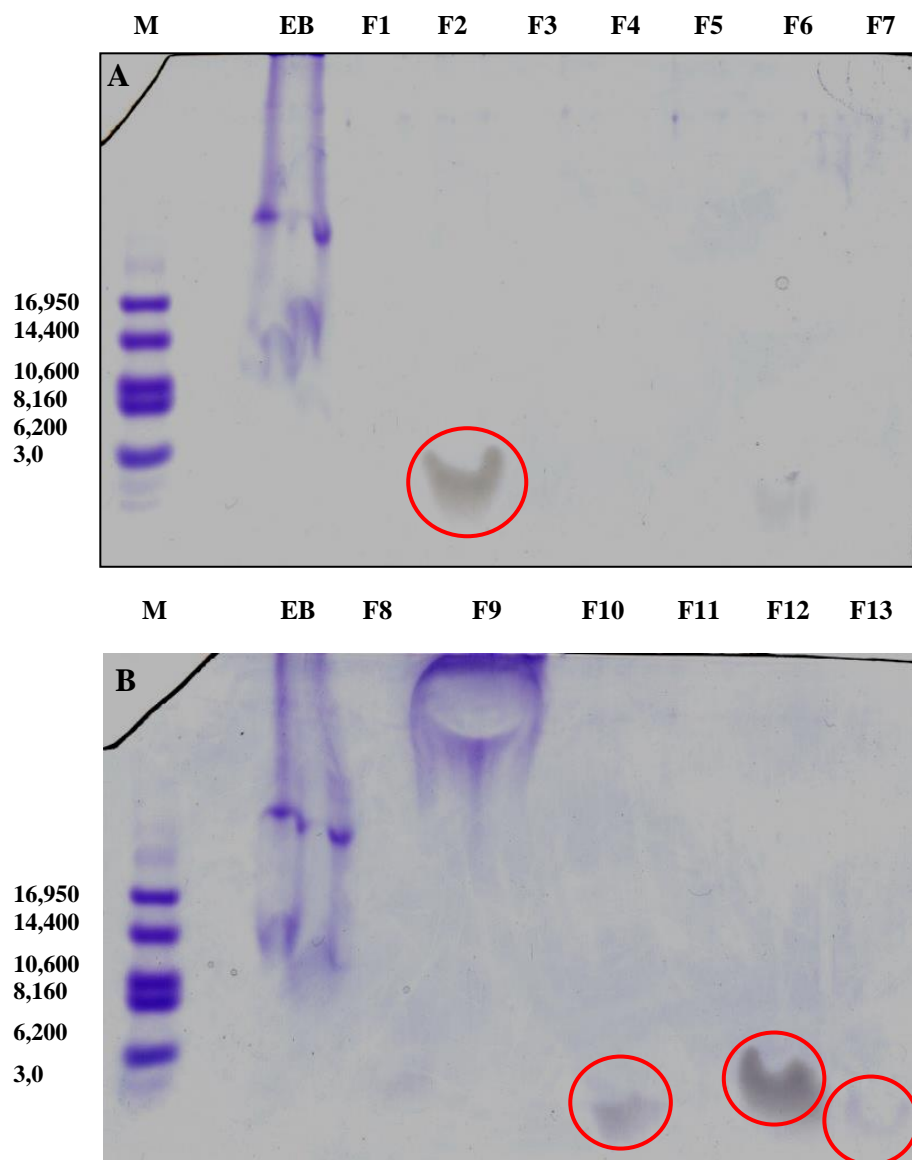


Figura 21: Eletroforese em gel de tricina da purificação dos peptídeos de coléteres de *P. tetraphylla*. **A e B** - M – Marcador de peso molecular, EB – Extrato bruto proteico, F1, F2, F3, F5, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 e F13 – Frações obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do extrato bruto proteico de coléteres de *P. tetraphylla*.

Isolamento, identificação e caracterização das bactérias presentes na secreção, nos coléteres e nas folhas de P. tetraphylla

Devido à presença de microrganismos tanto na secreção quando no interior das células secretoras dos coléteres de *P. tetraphylla*, desde o início de seu desenvolvimento, estes foram cultivados e isolados a fim de elucidar qual tipo de interação poderia estar sendo estabelecida.

A partir da secreção de *P. tetraphylla* foram isoladas 12 bactérias. Dentre esses, 6 isolados apresentaram formação de uma película aerotóxica nos dois meios seletivos utilizados para bactérias fixadoras de nitrogênio (LGI e JNFB). Do macerado dos coléteres foram isoladas 14 bactérias, sendo que 7 apresentaram formação de película aerotóxica em meios seletivos para bactérias fixadoras de nitrogênio. Do macerado das folhas foram isoladas 21 bactérias, sendo que 15 apresentaram formação de película aerotóxica (Tabela 2).

Tabela 5: Bactérias isoladas dos coléteres, da secreção e das folhas de *P. tetraphylla* cultivadas em meios seletivos e não seletivo.

Código	Diluição	Origem	Meio de Cultivo
1	-5	Secreção	DYGS sólido
2	-5	Secreção	DYGS sólido
3	-6	Secreção	DYGS sólido
4	-6	Secreção	DYGS sólido
5	-6	Secreção	DYGS sólido
6	-6	Secreção	DYGS sólido
7	-4	Secreção	JNFB semi-sólido
8	-3	Secreção	JNFB semi-sólido
9	-5	Secreção	JNFB semi-sólido
10	-3	Secreção	LGI semi-sólido
11	-4	Secreção	LGI semi-sólido
12	-6	Coléter	LGI semi-sólido
13	-5	Secreção	LGI semi-sólido
14	-5	Coléter	JNFB semi-sólido
15	-7	Coléter	LGI semi-sólido
16	-5	Coléter	LGI semi-sólido
17	-5	Coléter	DYGS sólido
18	-6	Coléter	DYGS sólido
19	-6	Coléter	DYGS sólido

20	-6	Coléter	DYGS sólido
21	-5	Coléter	DYGS sólido
22	-5	Coléter	DYGS sólido
23	-5	Coléter	DYGS sólido
24	-3	Coléter	LGI semi-sólido
25	-3	Coléter	LGI semi-sólido
26	-4	Coléter	LGI semi-sólido
27	-4	Primórdio	NB sólido
28	-5	Primórdio	NB sólido
29	-5	Primórdio	NB sólido
30	-5	Primórdio	NB sólido
31	-6	Primórdio	NB sólido
32	-6	Primórdio	NB sólido
33	-5	Primórdio	NB sólido
34	-5	1° nó	NB sólido
35	-5	2° nó	NB sólido
36	-5	2° nó	NB sólido
37	-5	2° nó	NB sólido
38	-4	Primórdio	LGI semi-sólido
39	-3	1 nó	JNFB semi-sólido
40	-3	Primórdio	JNFB semi-sólido
41	-3	Primórdio	JNFB semi-sólido
42	-3	Primórdio	JNFB semi-sólido
43	-3	Primórdio	JNFB semi-sólido
44	-3	Primórdio	JNFB semi-sólido
45	-3	2° no	JNFB semi-sólido
46	-3	2° no	JNFB semi-sólido
47	-4	Primórdio	LGI semi-sólido
48	-3	Primórdio	LGI semi-sólido
49	-6	Primórdio	LGI semi-sólido
50	-3	2° no	LGI semi-sólido
51	-3	3° no	LGI semi-sólido
52	-4	2° no	LGI semi-sólido
53	-4	2° no	LGI semi-sólido
54	-3	2° nó	LGI semi-sólido
55	-3	2° no	LGI semi-sólido
56	-4	Primórdio	LGI semi-sólido
57	-3	1° no	JNFB semi-sólido

Após o isolamento, 28 bactérias foram selecionadas de forma aleatória para a extração e sequenciamento do DNA genômico. Dentre esses, foram identificadas bactérias pertencentes a 8 gêneros (Tabela 3) sendo 9 *Burkholderia*, 4 *Pseudomonas*, 2

Sphingomonas, 1 *Bacillus*, 1 *Novosphingobium*, 1 *Luteibacter*, 1 *Enterobacter* e 1 *Staphylococcus*. Além desses gêneros, foram possíveis identificar 9 espécies, sendo 4 *Staphylococcus warneri*, 2 *Ralstonia pickettii*, 1 *Bacillus megaterium*, 1 *Pseudomonas palleroniana* e 1 *Microbacterium ginsengisoli*.

As bactérias do gênero *Burkholderia* foram detectadas tanto na secreção quanto nos coléteres e nas folhas. As do gênero *Pseudomonas*, na secreção e nos coléteres. As do gênero *Sphingomonas*, na secreção e nas folhas. A espécie *Staphylococcus warneri* foi encontrada em todos os 3 nós de folhas coletados.

Essas 28 bactérias também foram testadas quanto à capacidade de solubilização de minerais. Dessas, 14 foram capazes de solubilizar fósforo, 8 em solubilizar manganês e uma em solubilizar zinco (Tabela 3 e Fig. 21).

Tabela 6: Identificação das bactérias dos coléteres e da secreção de *P. tetraphylla* com base nos dados do NCBI e classificação quanto à solubilização de fósforo, manganês e zinco.

Código	Origem	Organismo Relacionado ¹	Identidade ²	P ³	Mn ⁴	Zn ⁵
1	Secreção	<i>Burkholderia sp.</i>	98%	-	-	-
2	Secreção	<i>Sphingomonas sp.</i>	96%	+	-	-
5	Secreção	<i>Bacillus megaterium</i>	98%	-	-	-
7	Secreção	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	+	-	-
8	Secreção	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	+	-	-
10	Secreção	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	99%	+	-	-
11	Secreção	<i>Novosphingobium sp.</i>	98%	-	-	-
17	Coléter	<i>Luteibacter sp.</i>	98%	-	-	-
18	Coléter	<i>Burkholderia sp.</i>	96%	-	-	-
19	Coléter	<i>Burkholderia sp.</i>	97%	-	-	-
21	Coléter	<i>Burkholderia sp.</i>	100%	-	-	-
22	Coléter	<i>Burkholderia sp.</i>	96%	-	-	-
23	Coléter	<i>Burkholderia sp.</i>	97%	-	+	+
24	Coléter	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	+	-	-
25	Coléter	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	+	-	-
26	Coléter	<i>Enterobacter sp.</i>	98%	+	+	-
27	Primórdio	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	97%	-	+	-
29	Primórdio	<i>Staphylococcus warneri</i>	96%	-	+	-
30	Primórdio	<i>Staphylococcus warneri</i>	95%	-	-	-

33	Primórdio	<i>Ralstonia pickettii</i>	99%	+	-	-
34	1° nó	<i>Gluconacetobacter sp.</i>	94%	-	+	-
35	2° nó	<i>Staphylococcus sp.</i>	98%	-	-	-
37	2° nó	<i>Staphylococcus warneri</i>	97%	+	-	-
43	Primórdio	<i>Burkholderia sp.</i>	93%	+	+	-
44	Primórdio	<i>Burkholderia sp.</i>	98%	+	+	-
48	Primórdio	<i>Burkholderia sp.</i>	97%	+	+	-
54	2° nó	<i>Sphingomonas sp.</i>	99%	-	-	+
55	2° nó	<i>Staphylococcus warneri</i>	98%	+	-	-
57	1° nó	<i>Ralstonia pickettii</i>	98%	+	-	-

¹Organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado de *P. tetraphylla* apresentou maior similaridade.

²Porcentagem de identidade entre a sequência do isolado de *P. tetraphylla* e a sequência do organismo relacionado.

³Caracterização quanto à solubilização de fósforo

⁴Caracterização quanto à solubilização de manganês

⁵Caracterização quanto à solubilização de zinco

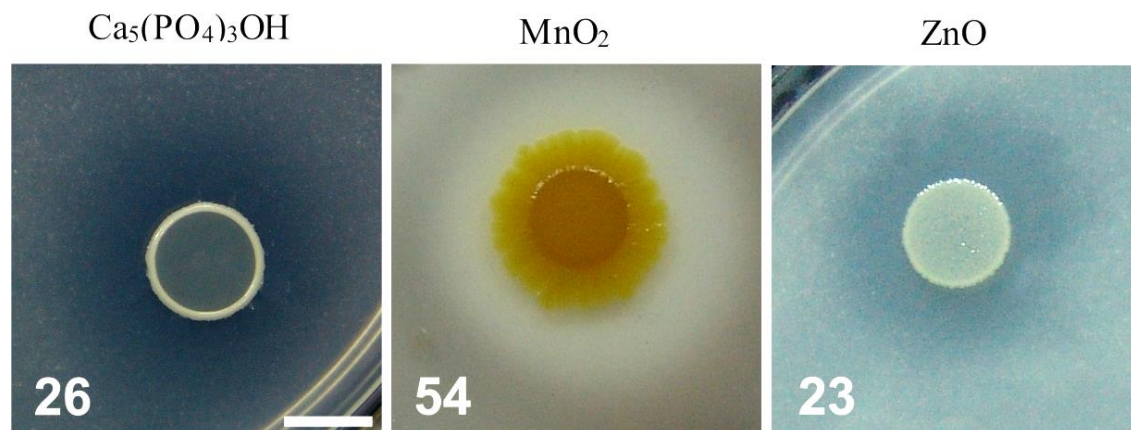


Figura 22: Caracterização das bactérias isoladas de *P. tetraphylla* quanto à solubilização de fósforo (26), manganês (54) e zinco (23). O halo translúcido ao redor da colônia denota a solubilização. Barra: 1 cm

12. Discussão

Ao longo dos estudos que tratam sobre coléteres diversas foram às funções atribuídas a estes. No entanto, as hipóteses que procuraram esclarecer o papel dessas estruturas nos vegetais carecem de embasamento experimental. Segundo Sheue (2013) são necessárias experiências específicas, delineadas objetivamente para comprovar ou não estas funções e esclarecer os papéis pouco estudados e mal compreendidos dos coléteres e conseqüentemente de suas secreções, nos diversos grupos de plantas.

As secreções dos coléteres são geralmente misturas complexas constituídas essencialmente por metabólitos primários e/ou secundários, e em *P. tetraphylla* foram detectados polissacarídeos mucilaginosos e proteínas, como evidenciado nos testes histoquímicos do primeiro capítulo. As proteínas nas secreções vegetais podem exercer ação antimicrobiana e contra herbivoria. Como proteínas que atuam na defesa podem-se destacar as lectinas, inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, polifenoloxidasas e peroxidases (Pinto *et al.* 2010). Neste trabalho duas concentrações do extrato proteico total da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* foram utilizadas em ensaios de inibição do crescimento de duas leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*) e um fungo filamentosos (*F. oxysporum*) e excetuando-se o tratamento 1 para *F. oxysporum*, houve inibição em todos os outros testes. Para *C. albicans* a inibição chegou a 70% com o tratamento 2. A ação antifúngica da secreção de coléteres já foi testada por Miguel *et al.* (2006) em *Bathysa nicholsonii* K. Schum, onde bioensaios com *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum lindemuthianum* mostraram diminuição no crescimento desses fungos quando inoculados juntos ao extrato proteico da secreção. E também por Leite (2012) que constatou que as secreções de coléteres de *P. rigida* e *T. formosa* inibem significativamente o crescimento de esporos fúngicos de *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Na secreção de *B. nicholsonii* foi detectada uma mistura de proteínas com massas moleculares de 66-24 kDa (Miguel *et al.* 2006) e na secreção de *S. glaziovii* proteínas com massas moleculares 45-14 kDa (Klein *et al.* 2004) tendo os dois perfis aparentemente uma proteína em comum com 29 kDa. Em *P. tetraphylla* o perfil obtido se mostra diferente denotando quatro peptídeos com massa molecular em torno de 6kDa.

Outro trabalho que nos leva à luz da função antimicrobiana dos coléteres é o de Vieira *et al.* (2006), onde a partir da secreção dos coléteres de *S. glaziovii* os autores

purificaram uma β -1,3-glucanase, proteína pertencente a uma família de enzimas que se destacam por hidrolisar ligações β -1,3 de glucanos, podendo clivar tanto componentes da parede celular de patógenos, como componentes endógenos da planta, que podem agir como eliciadores para a resposta de defesa vegetal.

Neste estudo, além de analisarmos a potencial inibição do crescimento de fungos na presença do extrato proteico total da secreção, também avaliamos o comprometimento da membrana desses microrganismos através da marcação com SYTOX Green, um corante que possui alta afinidade para ácidos nucleicos e penetra em células apenas quando sua membrana está danificada. Forte marcação foi observada nas células dos tratamentos, indicando a inviabilidade das células. Trabalhos sugerem que uma gama de proteínas e peptídeos antimicrobianos desempenham sua atividade através da permeabilização da membrana plasmática dos microrganismos, no entanto, pouco se sabe sobre os possíveis sítios de ligação dessas moléculas às estruturas da parede celular e membrana plasmática de fungos (Thomma *et al.* 2002; Thevissen *et al.* 1999).

Alterações na morfologia celular também foram notadas nas 3 espécies de fungos, após o tratamento 2 (escolhido para a análise por ter tido resultados mais significativos). Aglomerações celulares, diminuição no tamanho das células e deformações morfológicas foram detectadas, também indicando uma resposta dessas células à presença do extrato proteico e um potencial comprometimento da viabilidade desses organismos.

Além da considerável quantidade de secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* ter nos permitido investigar sua possível ação antifúngica, a presença de inúmeros microrganismos tanto na secreção quando nas células dos coléteres da espécie nos levou a estudar outra função sugerida para os coléteres, porém sem nenhuma comprovação experimental anterior, a relação da secreção ao desenvolvimento de microrganismos benéficos associados aos vegetais.

Lersten & Horner (1967) observaram bactérias na mucilagem secretada pelos coléteres de *P. bacteriophila* que, possivelmente habitariam nódulos na região dos estômatos das folhas adultas. Miller *et al.* (1983) enfatizaram que a mucilagem secretada por coléteres é essencial ao desenvolvimento de colônias de bactérias para posterior infecção e formação dos nódulos em *Psychotria kirkii* Hiern. (Rubiaceae), Klein *et al.* (2004) também relataram a presença de microrganismos embebidos na secreção, próximo à parede exterior das células dos coléteres, em *S. glaziovii*, e *S. rubra*.

No entanto nos trabalhos citados os microrganismos não foram identificados ou caracterizados, simplesmente foi relatada sua presença.

Há vários efeitos positivos atribuídos a microrganismos que habitam o interior ou a superfície de plantas como controle biológico de pragas e doenças, fixação biológica de nitrogênio e aumento da disponibilidade de macronutrientes e micronutrientes que se encontram na forma de compostos que a planta não consegue utilizar (Hallmann 1997; Döbereiner & Boddey 1981; Kennedy 1999; Downing *et al.* 2000; Verma *et al.* 2001; Cocking 2003). Dentre os macronutrientes destaca-se o fósforo que está envolvido em funções biológicas básicas como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios e metabolismo energético (Abel *et al.* 2002; Rausch & Bucher 2002; Schünmann *et al.* 2004) e é o segundo maior limitante para o crescimento e a produção de culturas agrícolas (Vance 2001). E dentre os micronutrientes destacam-se o magnésio que desempenha importante papel no transporte de elétrons na fotossíntese, é o elemento central da molécula de clorofila e ainda co-fator para várias enzimas-chave na biossíntese dos metabólitos secundários nas plantas (Burnell 1988) e o zinco que está relacionado ao metabolismo de carboidratos, proteínas e fosfatos, além de participar na formação da estrutura das auxinas, RNA e ribossomos (Borket 1989)

Em *P. tetraphylla* apesar de não ter sido observada a formação de nódulos, bactérias foram detectadas na superfície e no interior das folhas da espécie, microrganismos que possivelmente se abrigaram nos coléteres e usaram secreção enquanto a folha ainda estava em desenvolvimento.

Dos 11 gêneros de bactérias detectados nas amostras estudadas *Burkholderia* e *Pseudomonas* foram os mais frequentes. Bactérias do gênero *Burkholderia* foram as únicas detectadas na secreção, nos coléteres e nas folhas. Espécies desse gênero se destacam por formar nódulos em leguminosas e também se associarem à rizosfera e tecidos internos de gramíneas e por promover o crescimento em plantas pela fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios. Em Rubiaceae, espécies de *Burkholderia* formam nódulos bacterianos nas folhas de *Psychotria*. O estudo dessa complexa associação por Oevelen *et. al* (2003) em *P. kirkii*, mostrou que plantas não noduladas revelam alterações fenotípicas como malformação de folhas e indivíduos pouco desenvolvidos, indicando que a presença do endossimbionte é absolutamente necessária para o sucesso do hospedeiro. Em nosso estudo as espécies de *Burkholderia* isoladas da secreção e dos coléteres não expressaram a capacidade de fixar nitrogênio e as isoladas da folha cresceram em meios seletivos para bactérias que apresentam essa

capacidade e apresentaram formação de película aerotóxica, além de também serem capazes de solubilizar manganês. E uma bactéria isolada do coléter também expressou a capacidade de solubilizar manganês e zinco, mostrando assim seu potencial na promoção do crescimento vegetal.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de colonizar todas as superfícies das plantas (Espinosa & Urgel 2004) e também são encontradas colonizando endofiticamente várias espécies vegetais (Sessitch *et al.* 2002; Verma *et al.* 2001; Zinniel *et al.* 2002; Mocali *et al.* 2003) como visto em folhas de *Beta vulgaris* L. (Quenopodiaceae) (Ellis *et al.* 1999), raízes de espécies de *Triticum sp.* (Poaceae) e ramos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Duminelli *et al.* 2013). Devido à sua ampla distribuição no ambiente e facilidade de cultivo, esse gênero constitui-se em um dos grupos bacterianos melhor estudados (Aagot *et al.* 2001) e estão entre as principais bactérias promotoras do crescimento vegetal endofíticas empregadas na agricultura (Mariano *et al.* 2004). Em Rubiaceae, *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* é responsável por causar a mancha aureolada do cafeeiro (*Coffea arabica*) (Amaral *et al.* 1956), uma das principais doenças que acomete a espécie. Neste estudo todos os isolados de *Pseudomonas* foram cultivados em meios seletivos para bactérias fixadoras de nitrogênio resultando na formação de película aerotóxica e também foram capazes de solubilizar fósforo e apenas um isolado foi identificado em nível de espécie, a *Pseudomonas palleroniana* que foi encontrada na secreção dos coléteres. Ngamau *et al.* (2012) isolou esta espécie de cultivares de bananas (*Musa spp.*) e também detectou a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, solubilização de fósforo, além da produção de sideróforos, sugerindo a espécie como potencial biofertilizante microbiano.

No presente trabalho, uma bactéria do gênero *Enterobacter* foi isolada dos coléteres e além de produzir uma notável película aerotóxica no meio seletivo para bactérias fixadoras de nitrogênio e ser capaz de solubilizar manganês, nos chamou atenção pelo grande halo de solubilização formado na placa com fosfato de cálcio terciário. O gênero *Enterobacter* foi encontrado em várias culturas, como por exemplo, em plantas cítricas, batata doce, soja, milho e cana-de-açúcar (Raju 1972; Rennie 1982; Araujo *et al.* 2002; Zinniel *et al.* 2002; Asis & Adachi 2003; Kuklinsky-Sobral *et al.* 2004;) e muitas foram diazotróficas. Diversas linhagens do gênero também são consideradas promotoras do crescimento vegetal, pois independentemente de demonstraram a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, se mostram capazes de

produzir fitormônios, como o etileno, citocininas, auxina e ácido indol-3-acético (Ruppel 1992; Ferrara 2010) e solubilizar fosfatos (Da Silva 2005; Silva 2012).

Em relação ao potencial para fixar nitrogênio ainda foram encontradas as bactérias *Staphylococcus warneri* (isolado número 57) e *Ralstonia pickettii*, bactérias que também foram capazes de solubilizar fósforo. A fixação biológica de nitrogênio foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas da rizosfera e do rizoplane de uma grande variedade de plantas não-leguminosas (Döbereiner 1992). Porém evidências recentes mostram que algumas bactérias diazotróficas colonizam o interior da planta e são conhecidas como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio tendo grande importância no desenvolvimento vegetal (Olivares *et al.* 1996; Reinhold-Hurek *et al.* 2000; Ureta *et al.* 1995).

Além do isolado 57, outros três isolados também foram identificados como *Staphylococcus warneri* e possuíam características diferentes; o isolado 29 foi capaz de solubilizar manganês, o isolado 30 não foi capaz de solubilizar nenhum nutriente testado e o isolado 37 foi capaz de solubilizar fósforo, mostrando que provavelmente são diferentes cepas da espécie.

As bactérias podem apresentar diversos efeitos no desenvolvimento da planta hospedeira (Kuklinsky-Sobral *et al.* 2004), como incremento no crescimento, produtividade e defesa contra patógenos. Para a espécie em questão a relação com esses microrganismos deve ser mais bem estudada, no entanto nosso estudo consiste na etapa inicial para tal investigação.

Além da importância para a própria espécie, na agricultura também existe um particular interesse na detecção da diversidade bacteriana que desempenha funções específicas ou que vive em associação com plantas. Tais estudos visam também a busca de maior conhecimento e exploração desse grupo de microrganismos em processos agrícolas.

13. Conclusões

O extrato proteico da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* possui peptídeos com massa molecular em torno de 6 kDA.

Os resultados obtidos através do ensaio de inibição do crescimento de fungos, somados ao teste com o corante SYTOX Green e as alterações morfológicas nas células fúngicas mostram que o extrato proteico da secreção dos coléteres de *P. tetraphylla* compromete o funcionamento da membrana plasmática dos microrganismos testados, alterando sua permeabilidade a íons e moléculas orgânicas.

Das 57 bactérias isoladas a partir da secreção, dos coléteres e das folhas de *P. tetraphylla*, 28 apresentaram a capacidade de crescer em meio seletivo para bactérias fixadoras de nitrogênio e apresentaram a formação de película aerotóxica mostrando seu potencial para beneficiar os vegetais.

Dentre as bactérias isoladas, 29 foram identificadas por meio da análise molecular da região do gene 16S rRNA e pertenceram a 11 gêneros diferentes onde 14 delas apresentaram resultado positivo para solubilizar fósforo, 8 para solubilizar manganês, e uma para solubilizar zinco, denotando o potencial dessas bactérias para a promoção do crescimento vegetal.

Os resultados obtidos no trabalho ressaltam dois papéis descritos para os coléteres e suas secreções, a ação contra fungos e a atração e manutenção de um ambiente para proliferação de organismos benéficos. No entanto, este é um estágio inicial para a compreensão dessas complexas funções.

14. Referências Bibliográficas

- AAGOT, N.; NYBROE, O.; NIELSEN, P.; JOHNSEN, K.** 2001. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5233-5239.
- ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A.** 2002. Phosphate Sensing In Higher Plants. *Physiol. Plant.* 115: 1-8.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J.** 1997. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- AMARAL, J.F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D.** 1956. O bactério causador da mancha aureolada do cafeeiro. *Arquivos do Instituto Biológico* 23:151-155.
- ANDERSSON, L.** 2001. Margaritopsis (Rubiceae, Psychotriaceae) is a pantropical genus. *Syst. Geogr. Pl.* 71: 73-85.
- ANDERSSON, L. & ROVA, J.H.E.** 1999. The rps16 intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Pl. Syst. Evol.* 214:161-186.
- ANDREWS, J. H. & HARRIS, R. F.** 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Ann. Review Phytopathol.* 38: 145-80.
- ANDREASEN, K. & BREMER, B.** 2000. Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae Ixoroideae: Morphology, nuclear and chloroplast DNA data. *Amer. J. Bot.* 87: 1731– 1748.
- APPEZATO-DA-GLORIA, B. & ESTELITA, M.E.M.** 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Rev. Bras. Bot.* 23: 113-120.
- ARAÚJO, W. L.** 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 4906-4914.
- ASCENSÃO L.** 2007. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatômica. In: Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. (eds.), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, 19-28 p.
- ASIS, C. A. & ADACHI, K.** 2004. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and non diazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:19-23.
- BAKER, H. G. & BAKER, I.** 1973. Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241: 543–545.
- BAKER, H. G. & BAKER, I.** 1975. Studies of nectar constitution and pollinator-plant coevolution. In: Gilbert, L. E.; Raven, P. H. (eds.) *Coevolution of animals and plants*. University of Texas Press, Austin, 100–140 p.
- BALDANI, V.L.D.** 1996. *Efeito da inoculação de Herbaspirillum spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.* Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

- BARREIRO, D.P.** 2006. *Coléteres Dendróides em Alibertia sessilis (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae)*. Dissertação (Mestrado em Biociências), Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BARREIRO, D. P. & MACHADO, S. R.** 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. *Rev. Bras. Bot.* 30: 387-399.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E.** 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Ann. Review Phytopathol.* 33:145-172.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E.** 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathol.* 89:353-359.
- BERNARDES, L. M. C.** 1952. Tipos de clima do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Geo.* 14: 57-80.
- BREMER, B.; JANSEN, R. K.; OXELMAN, B.; BACKLUND, M.; LANTZ, K. & KIM, K. J.** 1999. More characters or more taxa for a robust phylogeny - Case study from the coffee family (Rubiaceae). *Syst. Biol.* 48: 413-435.
- BORGES, L. E.** 2006. *Caracterização estrutural da associação epifítica e endofítica entre microrganismos e plantas em um ambiente agrícola tropical*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- BORGES, E. E. DE L.; CASTRO, J. L. D.; BORGES, R. DE C. G.** 1992. Alterações fisiológicas em sementes de jacaré (*Piptadenia communis*) submetidas ao envelhecimento precoce. *Rev. Bras. Sementes* 14: 9-12.
- BORKET, C.M.** 1989. *Micronutrientes na planta*. In : Büll, L.T. & Rosolem, C.A. (Eds.). Interpretação de análise química de solo e planta para fins de adubação. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, Botucatu, p. 309-329.
- BOZHKOV, P.V. & LAM, E.** 2011. Green death: revealing programmed cell death in plants. *Cell Death Differ.* 18: 1239-1240.
- BRADFORD, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- BROEKAERT, W.F.; TERRAS, F.R.G.; CAMMUE, B.P.A. & VANDERLEYDEN, J.** 1990. An automated quantitative assay for fungal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 55-60.
- BURGER, W. C. & TAYLOR C. M.** 1993. Flora Costaricensis: Rubiaceae. *Fieldiana* 33:1-333.
- BURNELL, J. N.** 1988. *The biochemistry of manganese in plants*. In: Graham, R. D.; Hannam, R. J.; Uren, N. C. Manganese in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.125-137.
- BURSCH, W.** 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8:569-581.
- CABRAS, P.; ANGIANI, A.; TUBEROSO, C.; FLORIS, I.; RENIERO, F.; GUILLOU,**

- C.; GHELLI, S.** 1999 Homogentisic acid: A phenolic-acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4064–4067.
- CARDOSO, E.J.B.N. & FREITAS, S.S.** 1992. A rizosfera. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M. & Neves, M.C.P. (eds.) *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, p.41-57.
- CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A.** 2006. Composição e riqueza florística do componente arbóreo da Floresta Atlântica submontana na região de Imbaú, Município de Silva Jardim, RJ. *Acta Bot. Bras.* 20: 727-740.
- CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S.M.** 2007. *A célula*. 2ª Ed. Barueri, Manole Ltda, 396 p.
- CASTRO, M. M. & DEMARCO, D.** 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Nat. Prod. Comm.* 3:1273-1284.
- CASTRO, M. M. & MACHADO, S. R.** 2009. Células e tecidos secretores. In: Appezatto-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. (eds.). *Anatomia Vegetal (2ª ed.)*. UFV, Viçosa, 438p.
- CHAMBERLAIN, C.J.** 1932. *Methods in plant histology*. 5ª Ed. The University of Chicago Press, Chicago, 416 p.
- COCKING, E.** 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252:169-175.
- COELHO, C. P. & BARBOSA, A. A.** 2003. Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea*. *Aubl. Rev. Bras. Bot.* 26:403-413.
- CURTIS, J. D. & LERSTEN, N. R.** 1974. Morphology, seasonal variation and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *Am. J. Bot.* 61:835-845.
- CUTTER, E.G.** 1986. *Anatomia Vegetal. Parte 1: Células e Tecidos*. 2ª Ed. São Paulo, Rocca Ltda, 343 p.
- DA CUNHA, M. & VIEIRA, R. C.** 1997. Anatomia foliar de *Psychotria velloziana* Benth. (Rubiaceae). *Rodriguésia*. 49:39-50.
- DA SILVA, A.C.M.** 2007. *Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauzeiro*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- DANGL, J.L.; DIETRICH, R. A.; THOMAS.** 2000. Senescence and Programmed Cell Death. In: Buchanan, B.; Gruissen, W.; Jones R. (eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American society of Plant Physiologists, Maryland, 1044-1100 p.
- DANIAL, N.N. & KORSMEYER, S.J.** 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205-19.
- DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P.** 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38:647-655.

- DAVE, Y.; THOMAS, V.; KURIACHEN, P.M.** 1987. Structure and development of colleter of *Aganosma caryophyllata* G. Don. *Pakistan J. Bot.* 19:243-248.
- DAVE, Y.; KURIACHIEN, P.M.; THOMAS, V.** 1988. Development, structure and senescence of colleter in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). *Acta Soc. Bot. Pol.* 57:3-7.
- DAYAN, F.E. & DUKE, S.O.** 2003. Trichomes and root hairs: natural pesticide factories. *Pesticide outlook*. doi: 10.1039/b308491b
- DEINZER, M. L.; THOMPSON, P. A.; BURGETT, D. M.; ISAACSON, D. L.** 1977. Pyrrolizidine alkaloids: Their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Science* 195: 497-499.
- DELPRETE, P. G. & CORTÉS-B. R.** 2004. A phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using *trnL-F* and ITS sequence data. *Taxon* 53:347-356.
- DELPRETE, P.G. & JARDIM, J.G.** 2012. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* 63:101-128.
- DEMARCO, D.** 2005. *Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.)*. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DEXHEIMER, J. & GUENIN, F.** 1981. Étude de la sécrétion de mucilage par le trichomes stipulaires de *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *Cytol.* 46: 731-747.
- DICKISON, W. C.** 2000. *Integrative plant anatomy*. Harcourt Academic Press, San Diego, 533p.
- DÖBEREINER, J.** 1992. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e cultura* 44:310-313.
- DÖBEREINER, J. & BODDEY, R. M.** 1981. Nitrogen fixation in association with gramineae. In: Gibson, A. H; Newton, W.E. (eds). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Australian Academy of Science, Canberra, p. 305-312.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.** 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília, 60 p.
- DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A.** 2000. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA genes in sugarcane-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2804-2810.
- DURKEE, L.T.; BAIRD, C.W.; COHEN, P.F.** 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *Am. J. Bot.* 71:596-602.
- ECROYD C. E.; FRANICH R. A.; KROESE H. W.; STEWARD D.** 1995. Volatile constituents of *Dactyloctenium aegyptium* flower nectar in relation to flower pollination and browsing by animals. *Phytochemistry* 40: 1387-1389.
- ELLIS, R. J.; THOMPSON, I. P.; BAILEY, M. J.** 1999. Temporal fluctuations in the *Pseudomonas* population associated with sugar beet leaves. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:345-356.

- ESAU, K.** 1965. *Plant Anatomy*. 2ª Ed. John Wiley & Sons, New York, 767 p.
- ESAU, K.** 1977. *Anatomy of seed plants*. 2ª Ed. John Wiley & Sons, New York, 550 p.
- ESAÚ, K.** 1985. *Anatomia vegetal*. 3ª Ed. Ediciones Omega S.A., Barcelona, 779 p.
- ESPINOSA-URGEL, M.** 2004. Plant-associated *pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid* 52:139-150.
- FAHN, A.** 1979. *Secretory tissues in Plants*. London, Academic Press, 302 p.
- FAHN, A.** 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108: 229-257.
- FAHN, A.** 1990. *Plant Anatomy*. 4ª Ed. Pergamon Press, Oxford, 588 p.
- FERRARA, F. I. S.** 2010. *Influência do tipo de adubação na produção de aminoácidos e de ácido indol-3-acético, etileno e poliaminas por bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de canade-açúcar (Saccharum sp.)*. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FINK, S.L. & COOKSON, B.T.** 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73:1907-16.
- FISCHER, D.B.** 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*. 16:92-96.
- FJELL, I.** 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic J. Bot.*3:383-392.
- FRANCESCHI, V. R. & NAKATA, P. A.** 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56:41-71.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS.** 2011. Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2008-2010. Disponível: <http://www.inpe.br/noticias/arquivos/pdf/atlasrelatoriofinal.pdf>
Acesso em: 20/03/2013.
- GAFFAL, K. P.; FRIEDRISH, G. J.; EL-GAMMAL, S.** 2007. Ultrastructural Evidence for a Dual Function of the Phloem and Programmed Cell Death in the Floral Nectary of *Digitalis purpurea*. *Ann. Bot.* 99: 593-607.
- GANTER, P. & JOLLÉS, G.** 1969-1970. *Histochimie normale et pathologique*. Gauthier-Villars, Paris, 1904 p.
- GREEN, D. & KROEMER, G.** 1998. The central executioners of apoptosis caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8:267-271.
- GREGORY, M. & BAAS, P.** 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel J. Bot.* 38:125-174.
- GUEDES-BRUNI, R. R.** 1998. *Composição, estrutura e similaridade florística de dossel de 6 unidades de Mata Atlântica do Rio de Janeiro*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) USP, São Paulo, 231 p.
- HADFIELD, K.A & BENNETT, A.B.** 1997. Programmed senescence of plant organs. *Cell Death Differen* 4:662-670.

- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- HAWES, M.C. & BRIGHAM, L.A.** 1992. Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. *Adv Plant Pathol* 8:119-148.
- HESLOP-HARRISON, J. & KNOX, R.B.** 1981. Plant histochemistry: retrospect and prospect. In: Stoward, P.J.; Polak, J.M. (eds). *Histochemistry: the widening horizons*. John Wiley and Sons, Chichester and New York, 1-10 p.
- HODGES, D.M. & FORNEY, C.F.** 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J. Exp. Bot.* 51:645-655.
- HOEBERICHTS, F.A.; DE JONG, A.J.; WOLTERING, E.J.** 2005. Apoptotic-símilecell death marks the early stages of gypsophila (*Gypsophila paniculata*) petal senescence. *Postharvest Biol. Tech.* 35: 229-236.
- HORNER, H. T. & LERSTEN, N. R.** 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 55:1089-1099.
- HUDGINS, J. W.; KREKLING, T.; FRANCHESCHI, V. R.** 2003. Distribution of calcium oxalate crystals in the secondary phloem of conifers: a constitutive defence mechanism? *New Phytol* 159:677-690.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E. L.** 1997. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. *Pesq. Agro. Bras.* 8:807-818.
- INAMDAR, J. A.; BAGAVATHI SUBRAMANIAN, R.; MOHAN, J. S.** 1986. Studies on the resin glands of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *Ann. Bot* 58:425-429.
- IZADPANAH, A. & GALLO, R.L.** 2005. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52:381-390.
- JANI, G.K.; SHAH, D.P.; VIPUL, D.; PRAJAPATI, V.D.; VINEET, C.; JAIN, V.C.** 2009. Gums and mucilages: Versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J. Pharm. Sci.* 4:309-323.
- JOHANSEN, D. A.** 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York, 523 p.
- JOHANSSON, J. T.** 1987. Revision of the genus *Prismatomeris* Thw. (Rubiaceae, Morindae) *Opera Bot.* 94:1-62.
- JOLY, C.A.; LEITÃO-FILHO, H.F.; SILVA, S.M.** 1991. O patrimônio florístico In: Cecchi, J.C. & Soares, S.M. (eds.). *Mata Atlântica / Atlantic Rain Forest*. Fundação SOS Mata Atlântica 95-125p.
- JONES, A.M.** 2001. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.* 125: 94-97.
- JONES, D.L.** 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.** 1999. Plant systematics a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Massachusetts 565 p.

- KENNEDY, A.C.** 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agr. Ecosyst. Environ.* 74:65-76.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- KERR J.F.R.** 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicol.* 181-182:471-474.
- KLEIN, D.E.; GOMES, V.M.; SILVA-NETO, S.J.; CUNHA, M.** 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Ann. Bot.* 94: 733-740.
- KORTH, K. L.; DOEGE, S. J.; PARK, S. H.; GOGGIN, F. L.; WANG, Q.; GOMEZ, S. K.; LIU, G.; JIA, L.; NAKATA, P. A.** 2006. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defence against chewing insects. *Plant Physiol.* 141: 188-195.
- KRONESTED-ROBARDS, E. & ROBARDS, A.** 1991. Exocytosis in gland cells. In *Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants* (Hawea, C.; Coleman, J. & Evans, D. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 199-232 p.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.** 2004. Isolation and characterization of soybeab-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 12:1244-1251.
- KURIACHEN, P.M. & DAVE, Y.** 1989. Structural development and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). *J. Phytol. Res.* 2:7-14.
- LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M.** 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* 411: 848-853.
- LAMBERT, J. B.; HECKENBACH, E. A.; WU Y.; SANTIAGO-BLAY, J. A.** 2010. Characterization of plant exudates by principal-component and cluster analyses with nuclear magnetic resonance variables. *J. Nat Prod.* 73: 1643-1648.
- LEITÃO FILHO, H. F.** 1987. Considerações sobre a florística das Florestas Tropicais e Sub-Tropicais do Brasil. IPEF, n 35.
- LEITE, G. R.** 2012. *Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em Himatanthus obovatus (Apocynaceae)*. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Brasília.
- LERSTEN, N.R.** 1974a. Morphology and distribution of Colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 61: 973-981.
- LERSTEN, N. R.** 1974b. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Bot. J. Linn. Soc.* 69: 125-136.
- LERSTEN, N.R. & HORNER, H.T.** 1967. Development and structure of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *J. Bacteriol* 94:2027-2036.
- LERSTEN, N.R. & HORNER, H.T.** 1968. Development, structure and function of secretory

trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 55:1089-1099.

- LEVINE, B. & KLIONSKY, D. J.** 2004. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Develop. Cell.* 6:463-477.
- LUM, J.J.; DEBERARDINIS, R.J.; THOMPSON, C.B.** 2005. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:439-48.
- LÜTTGE, U.** 1971. Structure and function of plant glands. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 22:23-44.
- MCCABE, P. E. & LEAVER, C. J.** 2000. Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol. Biol.* 44:359-368.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P. N.; DONATO, V. M. T. S.** 2004. *Importância de Bactérias Promotoras de Crescimento e de Biocontrole de Doenças de Plantas para uma Agricultura Sustentável.* Recife: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica 1:89-111.
- MARSCHNER, H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, 889 p.
- MAZLIAK, P.** 1981. Regulation a court terme et a long terme de l'activite des enzymes membranes par la temperature. *Physiol. Veg.* 19:543-563.
- MERCIER, J. & LINDOW, S.E.** 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369-374.
- MIGUEL, E.C.; GOMES, V.M.; DE OLIVEIRA, M.A.; DA CUNHA, M.** 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, secretion protein composition and antifungal activity. *Plant Biol.* 8: 715-722.
- MIGUEL, E.C.; MORAES, D.G.; DA CUNHA, M.** 2009. Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. *Acta Bot.Bras.* 23:1034-1039.
- MIGUEL, E.C.; KLEIN D. E.; DE OLIVEIRA, M.A.; DA CUNHA, M.** 2010. Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* K. Schum. and *B. stipulata* (Vell.) C. Presl. (Rubiaceae). *Rev. Bras. Bot.* 33:455-466.
- MILLER, I. M.; SCOTT, A.; GARDNER, I. C.** 1983. The development, structure and function of dendroid colleters in *Psychotria kirkii* Hiern (Rubiaceae). *Ann. Bot.* 51:621-630.
- MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.** 2003. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res. Microbiol.* 154:105-114.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J. R.** 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectarines of *Plumeria rubra* L. *Ann. Bot.* 57: 389-401.
- MORELLATO, L. P. C. & HADDAD, C.F.B.** 2000. Introduction: The Brazillian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786-792.
- MORIM, M. P.** 2006. Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do Parque

Nacional do Itatiaia, sudeste do Brasil: padrões de distribuição. *Rodriguésia* 57:27-45.

MORIM, M. P. & BARROSO, G. M. 2007. Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste do Brasil: subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae. *Rodriguésia* 58: 423-468.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:453-858.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K.J. 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbc L sequence data. *Syst. Bot.* 24: 5-27.

NGAMAU, C. N.; MATIRU, V. N.; TANI, A.; MUTHURI, C. W. 2012. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa spp.*) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African J. Microbiol. Res.* 6:6414-6422.

NODEN, L.D. & LEOPOLD, A. C. 1988. The phenomenon of senescence and aging. In: *Senescence and aging in plants*. Academic Press, San Diego, 2-50 p.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils* 21:197-200.

PAIVA, E. A. S. 2009. Occurrence, structure and functional aspects of the colleter of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *C. R. Biologies* 332: 1078-1084.

PAIVA, E. A. S. & MACHADO, S. R. 2006b. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Braz. J. Biol* 66:301-308.

PAIVA, E. A. S.; MORAIS, H. C.; ISAIAS, R. M. S.; ROCHA, D. M. S.; OLIVEIRA, P. E. 2001. Occurrence and structure of extrafloral nectaries in *Pterodon pubescens* Benth. and *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. (Fabaceae-Papilionoideae). *Pesq. Agropec. Bras.* 36:219-224.

PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. 2005. *Enzyme Technology*. Asiatech Publishers, New Delhi, 760p.

PEREIRA, I. M.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; BOTELHO, S. A.; CARVALHO, W. A. C.; FONTES, M. A.L.; SCHIVIANI, I.; SILVA, A. F. 2006a. Composição florística do compartimento arbóreo de cinco remanescentes florestais do maciço do Itatiaia, Minas Gerias e Rio de Janeiro. *Rodriguésia* 57:103-126.

PEREIRA, R.; CARVALHO I. S.; AZEVEDO D. A. 2006b. Afinidades paleobotânicas de âmbares cretácicos das bacias do amazonas, araripe e recôncavo. *Geociências* 25:217-224.

PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233:977-980.

PIESSCHAERT, F.; HUYSMANS, S.; JAIMES, I.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. 2000.

Morphological evidence for an extended tribe – Coccocypseleae (Rubiaceae-Rubioideae). *Plant Biol.* 2:536-546.

- PINTO, M. DOS S. T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E. A. G.** 2011. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. *Rev. Bras. Biociências* 9:241-248.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B.** 1968 Morphology of the “squamellae” in the light of their ontogeny. *Curr. Sci.* 18:520-522.
- RAUSCH, C. & BUCHER, M.** 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37.
- RENNIE, R. J.; DE FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B.** 1982. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum sp.*). *Can. J. Microbiol.* 28: 462-467.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER J. P.; MARTENSEN A. C.; PONZONI F. J.; HIROTA, M. M.** 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conservation* 142:1141-1153.
- RIO, M. S.; CASTRO, M. M.; KINOSHITA, L. S.** 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Rev. Bras. Bot.* 25:339-349.
- RIO, M.C.S.** 2006. *Estudos anatômicos em espécies de Forsteronia G.Mey (Apocynaceae) de cerrado.* Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ROACH, D. A.** 1993. Evolutionary senescence in plants. *Genetica* 91:53-64.
- ROBBRECHT, E.** 1987. The african genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae).4. A Revision of the species of section *Tricalysia* and section *Rosea*. *Bull. Nat. Plant. Belg.* 57:39-208.
- ROBBRECHT, E.** 1978. *Sericanthe*, a new African genus of Rubiaceae (Coffeeae). *Bull. Nat. Plant. Belg.* 48:3-78.
- ROBBRECHT, E.** 1983. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae) 3. *ProbletoSTEMON* revived as a section of subgenus *Tricalysia*. *Bull. Nat. Plant. Belg.* 53:299-320.
- ROBBRECHT, E.** 1988. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Bot. Belg. Meise.* 271p.
- RODRIGUEZ-ARCE, A. L. & DIAZ, N.** 1992. The stability of beta-carotene in mango nectar. *J. Agr. U. Puerto Rico* 76:101-102.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O.** 1986. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol.* 12:16 (resumo).
- ROSE, T.L.; CONCEIÇÃO, A.DA S.; XAVIER-FILHO, J.; OKOROKOV, L.A.; FERNANDES, K.V.S.; MARTY, F.; CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M.** 2006. Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil* 286:181-191.
- ROSHCHINA, V. V. & ROSHCHINA, V.D.** 1993. *The excretory function of higher plants.* Springer Verlag, Berlin, 314p.

- ROVA, J.H.E.; DELPRETE, P.G.; ANDERSON, L.; ALBERT, V.A.** 2002. A trnL-F CPDNA sequence study of Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of Rubiaceae. *Am. J. Bot.* 89:145-159.
- RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, O. SCHMELZER, R.** 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat – an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil* 145:261–273.
- SHEUE, C.R.; CHEN, Y.J.; YANG, Y.P.** 2012. Stipules and colleters of the mangrove Rhizophoraceae: morphology, structure and comparative significance. *Bot. Studies* 53: 243-254.
- SHEUE, C.R.; CHESSON, P.; CHEN, Y.; WU, S.; WU, Y.; YONG, J.W. H.; GUU, T.; LIM C.; RANDRIANASOLO, R. M. A.; RAZANAJATOVO, M. H.; YANG, Y.** 2013. Comparative systematic study of colleters and stipules of Rhizophoraceae with implications for adaptation to challenging environments. *Bot. J. Linn. Soc.* 172:449-464.
- SCHULTZ, T. R. & MCGLYNN, T.** 2000. The interactions of ants with other organism. In: Agosti, D.; Majer, J. D.; Alonso, L. E.; Schultz, T. R., eds. *Ants: Standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, p. 35-44 .
- SCHÜNMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; SMITH, F. W.; E DELHAIZE, E.** 2004. Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Experim. Bot.*55: 855- 865.
- SCHWARZ, E. A. & FURLAN, A.** 2002. Coléteres foliares de *Oxypetalum* R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) — aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). *Acta Biol. Parana.* 31:79-97.
- SCHÄGGGER, H. & VON JAGOW, G.** 1987 Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E.** 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39:23-32.
- SILVA, C. A. & BRAGA, M. R.** 2004. Liberação e atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em rubiáceas tropicais: influência da metilesterificação de pectinas. *Rev. Bras. Bot.* 27:379-393.
- SILVA, N. D.** 2012. *Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato e análise do seu efeito sobre o desenvolvimento de plantas de Arabidopsis thaliana*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V.** Óleos Voláteis. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann,G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 467-495 p.
- SOLEREDER, H.** 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford, 1182 p.

- SOUZA, V.C. & LORENZI, H.** 2008. *Botânica sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa, 703 p.
- SUBRAMANIAN, R.B.; MURUGAN, V.; MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A.** 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretions of resin glands in some Apocynaceae. *Proceedings of Indian Academy Sciences. Plant Sci.* 99: 423-429.
- TAN, S.; JIANG, Y.; SONG, S.; HUANG, J.; LING, N.; XU, Y.; SHEN, Q.** 2013. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop. Prot.* 43:134-140.
- TAYLOR, C. M.** 1996. Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the Neotropics. *Opera Bot. Belg.* 7:261-270.
- TAYLOR, C. M.** 1997. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 84: 224-262.
- TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D.** 2007. Flora of the Ducke Reserve. *Rodriguesia* 58:549-616.
- THEVISSSEN, K.; TERRAS, F.R.G.; BROEKAERT, W.F.** 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5451-5458.
- THOMMA, B.P.H.J.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K.** 2002. Plant defensins. *Planta* 216:193-202.
- THOMAS, V. & DAVE, Y.** 1989a. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (N. odorum Soland., Apocynaceae). *Korean J. Bot.* 32:163-172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y.** 1989b. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *Ann. Bot.* 64:201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y.** 1989c. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Ind. Bot. Contact.* 6:25-29.
- THOMAS, V.; DAVE, Y.; MENON, A.R.S.** 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic J. Bot.* 8:493-496.
- THOMAS, V.** 1991. Structural, functional e phylogenetic aspects of the colleter. *Ann. Bot.* 68:287-305.
- TORRES, L. E. S. & VARGAS, F. D.** 2003. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc. Pec. Méx.* 41:49-62.
- TRINDADE, F. G.** 2013. *Anatomia e ultraestrutura comparada dos coléteres de espécies de Psychotria L. (Rubiaceae) em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- TUKEY, H. B.** 1970. The leaching of substances from plants. *Ann. Review of Plant Physiol.* 21: 305-324.

- TULLII, C. F.; MIGUEL, E. C.; LIMA, N. B.; FERNANDES, KÁTIA V. S.; GOMES, V. M.; DA CUNHA M.** 2013. Characterization of stipular colleters of *Alseis pickelii* Pilger et Shmale (Rubiaceae). *Botany Online* first doi: 10.1139/cjb-2012-0249.
- URETA, A; ALVAREZ, B.RÁMON, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G.** 1995. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant and Soil* 127: 271-277.
- VANCE, C.P.** 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition : plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* 127:390 -397.
- VAN DOORN, W. G. & WOLTERING, E. J.** 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plant. *Trends Plant Sci.* 10: 117-122.
- VAN DOORN, W.G.** 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J. Exp. Bot.* 62: 4749-4761.
- VAN HOVE, C.** 1972. Structure and initiation of nodules in the leaves of *Neorosea andongensis* (Hiern) N. Hallé. *Ann. Bot.* 36:259-262.
- VAN OEVELEN, S.; DE WACHTER, R.; ROBBRECHT, E.; PRINSEN, E.** 2003. Induction of a crippled phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial endophyte. *Bulg. J. Plant Physiol.* Special Issue: 242-247.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K.** 2001. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127-141.
- VIEIRA, F.A.; DA CUNHA, M.; KLEIN, D.E.; CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M.** 2006. Purification and characterization of beta-1, 3-glucanase from the secretion of *Simira glaziovii* colleters (Rubiaceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49: 881-888.
- VITARELLI, N. C. & SANTOS, M.** 2009. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.* 23: 923-928.
- VOGEL S.** 1969. *Flowers offering fatty oil instead of nectar.* Abstracts XI th Internatl. Bot. Congr. Seattle, 229 p.
- VOGEL S.** 1990. History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoir. New York Bot. Gard.* 55: 130-142.
- WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E. ; VIVANCO, J. M.** 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132: 44-51.
- WARD, D. SPIEGEL, M. & SALTZ, D.** 1997. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *J. Chem. Ecol.* 23:333-346.
- WILLIAMS, B. & DICKMAN, M.** 2008. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol. Plant Pathol.* 9:531-544.
- WILLIS, R.J.** 2007. *The History of Allelopathy.* Springer, London, 300 p.
- WOODSON Jr., R.E. & MOORE, J.A.** 1938. *The vascular anatomy and comparative*

morphology of apocynaceous flowers. *Bull. Torr. Bot. Club* 65:135-165.

ZAPPI, D. & TAYLOR, C. 2010. *Palicourea* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. 03/12/2013.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol* 68:2198-2208.