

Elicidores de fitoalexinas de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) obtidos por autoclavagem

Eldemar de Souza Xavier¹, Claudia Alves da Silva¹, Fábio Moraes¹ e Marcia Regina Braga^{1,2}

Recebido: 23.06.2003; aceito: 10.02.2004

ABSTRACT - (Phytoalexin elicitors from cell walls of *Alibertia myrcifolia* and *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) obtained by autoclaving). Phytoalexin elicitors were obtained from leaf cell walls of *Alibertia myrcifolia* and *Rudgea jasminoides*, two tropical Rubiaceae species with different behavior toward phytoalexin production, by autoclaving. Fragments active on soybean cotyledons were found in both species, indicating that their presence in cell walls is not related to the plant capacity of synthesizing these defensive compounds. Anion exchange chromatography revealed distinct profile of the two species, the eliciting activity being much higher in *R. jasminoides*. Hydrolysis with endopolygalacturonase resulted in reduction of less than 30% in the eliciting activity for both species. These results suggest that pectin fragments previously described as the main eliciting molecules in other plant species, contributed as a small part of the total activity detected in these two Rubiaceae. Neutral fragments seem to be responsible for most of the eliciting activity detected in the extracts, although the role and the mechanism of their production during induction of plant defensive responses *in vivo* remain unknown.

Key words: elicitor, phytoalexin, carbohydrates, oligosaccharins

RESUMO - (Elicidores de fitoalexinas de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) obtidos por autoclavagem). Elicidores da síntese de fitoalexinas foram obtidos a partir de autoclavagem das paredes celulares de folhas de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*, duas rubiáceas nativas tropicais que diferem quanto à capacidade de produzir substâncias de defesa (fitoalexinas). Carboidratos que possuem atividade indutora de fitoalexinas em soja foram encontrados nos autoclavados das paredes celulares de ambas as espécies, indicando que a presença dos mesmos não está relacionada à capacidade da planta em responder ou não com a produção de fitoalexinas. O fracionamento dos autoclavados em coluna de troca iônica revelou a existência de perfis distintos para as duas espécies, sendo a atividade eliciadora bastante superior em *R. jasminoides*, espécie que responde com a produção de fitoalexinas quando inoculada com fungos. A hidrólise com endopoligalacturonase resultou em perda de menos do que 30% da atividade eliciadora para ambas as espécies. Esses dados sugerem que fragmentos de pectina da parede celular, descritos como os principais eliciadores derivados de plantas, contribuem apenas em parte para a atividade indutora observada nos autoclavados das duas espécies estudadas e que fragmentos neutros derivados da parede celular podem exercer essa atividade, embora os mecanismos relativos a sua liberação e papel durante a indução de respostas de defesa *in vivo* ainda sejam desconhecidos. **Palavras-chave:** eliciador, fitoalexinas, carboidratos, oligossacarinas

Introdução

Muitas espécies vegetais respondem à invasão microbiana através da síntese localizada de substâncias de defesa, denominadas fitoalexinas. Essas substâncias, ausentes nos tecidos da planta sadia, passam a ser sintetizadas e acumuladas junto ao sítio de infecção após o contato com microorganismos ou produtos deles derivados, conhecidos como eliciadores (Smith 1996, Harborne 1999).

Estudos realizados com o objetivo de identificar e caracterizar moléculas indutoras de fitoalexinas levaram à descoberta que paredes celulares das

próprias plantas também possuem eliciadores em sua estrutura (Hargreaves & Bailey 1978, Hahn *et al.* 1981). Esses eliciadores, derivados de polissacarídeos pécticos da parede celular, são formados por 12 ou mais resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4 (oligogalacturonídeos) (Nothnagel *et al.* 1983, Côté & Hahn 1994). A liberação de oligogalacturonídeos tem sido relacionada à atividade de hidrolases microbianas vegetais, especialmente pectinases (endopoligalacturonases e pectina- e pectato-liases), secretadas ou liberadas durante a interação entre a planta e o patógeno (Davis *et al.* 1984, Cervone *et al.* 1987, 1989, Hahn *et al.* 1989,

1. Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.

2. Autor para correspondência: bragamr@canalvip.com.br

Alghisi & Favaron, 1995).

Braga *et al.* (1998), estudando as paredes celulares de duas rubiáceas nativas tropicais que diferem quanto à capacidade de produzir fitoalexinas, observaram diferenças nos teores e composição das pectinas entre as duas espécies. Diferenças também foram encontradas na atividade e estabilidade dos eliciadores liberados por autoclavagem e por hidrólise enzimática das paredes celulares de folhas dessas rubiáceas (Braga & Dietrich 1998). A análise desses eliciadores, através de cromatografia líquida de alta eficiência, revelou a presença de oligogalacturonídeos apenas em autoclavados obtidos de *Rudgea jasminoides*, espécie que produz fitoalexinas (Braga & Dietrich 1998). Isso levou à sugestão de que eliciadores liberados a partir de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* (espécie que não produz fitoalexinas quando inoculada com fungos) pudessem ter composição distinta daqueles derivados de *R. jasminoides*, o que poderia refletir o comportamento diferencial observado com relação à produção de fitoalexinas para essas duas espécies.

Moléculas eliciadoras obtidas de plantas exibem atividade indutora em concentrações extremamente baixas, o que dificulta seu isolamento e conseqüentemente sua caracterização estrutural. Neste trabalho, eliciadores obtidos por autoclavagem das paredes celulares das duas espécies de Rubiaceae que apresentam resposta fitoalexínica distinta foram comparados através da análise de algumas de suas propriedades químicas.

Material e métodos

Material vegetal - folhas jovens e sem lesões visíveis de *Alibertia myrcifolia* (Spruce ex Schum.) Schum. (SP28307) e de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (SP161348) foram coletadas na mata da Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Instituto de Botânica de São Paulo. Cotelédones de soja (*Glycine max* L. Merr. IAC-8) foram obtidos a partir de plântulas crescidas por oito dias em casa de vegetação, sob fotoperíodo de 14 horas.

Extração do eliciador de paredes celulares de folhas - paredes celulares foram extraídas a partir de folhas frescas conforme descrito por Braga *et al.* (1998). Cerca de 0,5 g das paredes celulares foram suspensas em 50 ml de água destilada e submetidas a autoclavagem a 121 °C, 1,5 atm, por 50 minutos. O

resíduo insolúvel foi removido através de filtração em papel de fibra de vidro (GF/A Whatman) e os filtrados armazenados a -20 °C, até serem analisados quanto ao conteúdo de açúcares totais, ácidos urônicos e ensaiados quanto à sua atividade indutora de fitoalexinas em cotelédones de soja.

Cromatografia de troca iônica - alíquotas dos autoclavados de paredes celulares foram reduzidas a 1/10 do seu volume inicial por liofilização e aplicadas em coluna de QAE-Sephadex (1,3 × 22,0 cm), equilibrada com tampão imidazol 125 mM, pH 7,0. A eluição foi efetuada em gradiente, utilizando tampão imidazol 125, 550, 750 mM e 1 M (Nothnagel *et al.* 1983), sendo coletadas frações de 2 ml. Essas frações foram reunidas de acordo com o seu conteúdo de açúcares neutros e de ácidos urônicos e o sal eliminado através de diálise (limite de exclusão 1 kDa) em água deionizada. As frações reunidas foram ensaiadas em cotelédones de soja para avaliação da atividade indutora de fitoalexinas. Em uma segunda análise, alíquotas dos autoclavados foram submetidas à cromatografia de troca iônica nas mesmas condições acima, porém, utilizando-se a eluição apenas com tampão imidazol 125 mM e 1 M.

Bioensaio em cotelédones de soja - a atividade indutora de fitoalexinas foi avaliada em cotelédones de soja, de acordo com procedimento descrito por Ayers *et al.* (1976), uma vez que as rubiáceas nativas apresentam resposta fitoalexínica sazonal (Braga *et al.* 1991), o que dificulta seu uso em bioensaios. Desse modo, grupos de cinco cotelédones de soja, em triplicatas, foram utilizados para cada determinação. O eliciador de esporos do fungo *Mucor ramosissimus*, extraído conforme descrito por Cordeiro Neto & Dietrich (1992), foi utilizado como controle positivo de indução. A presença de gliceolina, fitoalexina produzida por cotelédones de soja, foi avaliada através de medida da absorbância a 286 nm dos exsudados de cotelédones incubados por 20 horas, no escuro (Ayers *et al.* 1976). A quantidade de gliceolina foi calculada com base em curva padrão com gliceolina purificada. Como a intensidade da resposta dos cotelédones varia entre diferentes ensaios adotou-se, para fins de comparação, a atividade dos difusatos de *M. ramosissimus* como máxima (Amáx.) e os resultados, em alguns casos, foram também expressos dividindo-se a atividade das amostras (A) por Amáx.

Determinações quantitativas de açúcares - o conteúdo de açúcares neutros nos autoclavados e nas frações

provenientes da coluna de troca iônica foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) e o de ácidos urônicos utilizando-se *m*-hidroxibifenil (Filizetti-Cozzi & Carpita 1991). Glucose e ácido galacturônico (100 µg/ml) foram utilizados como padrões. O conteúdo de carboidrato total foi estimado somando-se as quantidades obtidas dos ensaios de açúcares neutros e ácidos urônicos. Embora seja um pouco superestimada, a quantificação de carboidrato total por essa soma pode ser utilizada, uma vez que no ensaio colorimétrico utilizado para medir açúcares neutros, os ácidos urônicos presentes na amostra contribuem com apenas 8% da cor resultante (Nothnagel *et al.* 1983).

Hidrólises ácida e enzimática - alíquotas das frações reunidas a partir da coluna de QAE-Sephadex foram hidrolisadas com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M em ampolas seladas, a 120 °C, por 1 hora (Fry 1988). Os hidrolisados foram centrifugados a 2000 g por 15 minutos e o ácido presente nos sobrenadantes eliminado por evaporação sob vácuo e lavagens sucessivas com metanol. Os sobrenadantes secos foram dissolvidos em 1 ml de água deionizada e mantidos a -20 °C até serem analisados quanto a sua composição em monossacarídeos neutros por cromatografia líquida de alta eficiência.

Alíquotas das frações provenientes da segunda análise por coluna de troca iônica e eluição com 125 mM e 1M de imidazol foram incubadas com endopoligalacturonase (Endo-PG) Megazyme por oito horas, a 30 °C, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Como controles foram utilizadas incubações das frações sem a presença da enzima e de 20 mg de paredes celulares de *R. jasminoides* com Endo-PG, sob as mesmas condições descritas acima. As reações foram interrompidas por fervura a 100 °C, por 5 minutos. Os hidrolisados foram centrifugados a 1.000 g durante 10 minutos e os sobrenadantes submetidos à filtração em papel Whatman GF/A. Os filtrados resultantes foram submetidos à quantificação de ácidos urônicos e ao bioensaio em cotilédones de soja para avaliação da atividade indutora de fitoalexinas.

Cromatografia líquida de alta eficiência - os monossacarídeos neutros obtidos por hidrólise ácida das frações da primeira coluna de troca iônica foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex DX-500. A

análise foi efetuada em coluna CarboPac PA-10 tendo NaOH 20 mM isocrático como eluente e os açúcares identificados por comparação com os tempos de eluição de padrões puros de monossacarídeos, analisados nas mesmas condições.

Fragmentos de pectina (oligogalacturonídeos) presentes nas frações da coluna e nos hidrolisados enzimáticos obtidos por incubação com Endo-PG foram também analisados por HPAEC/PAD, em coluna Carbo-Pac PA-1, utilizando um gradiente linear de 400 a 900 mM de acetato de sódio em 100 mM de NaOH, de 2 a 50 minutos (Spiro *et al.* 1993). Foi utilizada pós-coluna contendo 500 mM de NaOH e o tempo de retenção dos oligogalacturonídeos foi comparado com aqueles obtidos para oligômeros padrão com grau de polimerização de 5 a 22, obtidos a partir de pectina de *Citrus*, gentilmente cedidos pelo Dr. Stephan Ebehard (University of Georgia - EUA).

Resultados e Discussão

Através da tabela 1, pode-se observar que as quantidades de carboidratos diferem nos autoclavados de paredes celulares de folhas nas duas rubiáceas analisadas. O autoclavado de *A. myrcifolia* apresenta maior quantidade de açúcares neutros, porém menor teor de ácidos urônicos quando comparado à *R. jasminoides*. Braga *et al.* (1998) relataram maior conteúdo de pectinas em paredes celulares de *R. jasminoides*, o que explica a maior liberação de ácidos urônicos nos autoclavados dessa espécie. Em relação à atividade eliciadora da síntese de fitoalexinas em soja, quando os resultados foram expressos em termos de quantidade de açúcares neutros aplicados por cotilédone, também foram observadas diferenças entre as espécies, sendo a mesma maior para *R. jasminoides*, conforme anteriormente relatado por Braga & Dietrich (1998). Quando o cálculo foi feito pela soma dos valores de açúcares neutros + ácidos urônicos, a atividade indutora foi um pouco superior para *A. myrcifolia*, como resultado das diferenças entre as proporções de açúcares neutros e ácidos urônicos nos autoclavados das paredes celulares das espécies em questão.

Apesar dessas diferenças, os resultados demonstram que nos extratos brutos obtidos das paredes celulares de ambas as espécies existem carboidratos que possuem atividade indutora de fitoalexinas em soja, e que, a presença dos mesmos não está relacionada à capacidade da planta em

Tabela 1. Conteúdo de açúcares neutros, ácidos urônicos e atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja dos autoclavados de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*.

Espécie/Amostra	Açúcares neutros (mg/g de parede autoclavada)	Ácidos urônicos (mg/g de parede autoclavada)	Atividade indutora de fitoalexinas		
			(μ moles gliceolina/ cotilédone)	A/Amáx.	
<i>Alibertia myrcifolia</i>	141,5	14,3	74,1*	43,7**	0,54
<i>Rudgea jasminoides</i>	105,0	25,2	82,1*	40,0**	0,50
<i>Mucor ramosissimus</i> (eliciador)	–	–	80,6	–	1,00
Controle (água)	–	–	15,0	–	0,19

* valores expressos em 50,0 μ g equivalentes em açúcares neutros ou ** de carboidrato total (açúcares neutros + ácidos urônicos) aplicados por cotilédone, – não quantificado.

responder ou não com a produção de fitoalexinas, uma vez que vários trabalhos mencionam a incapacidade de *A. myrcifolia* produzir esses metabólitos de defesa quando suas folhas são inoculadas com fungos (Braga *et al.* 1986, 1991, Cordeiro Neto & Dietrich 1992).

O fracionamento dos autoclavados das paredes celulares por cromatografia de troca iônica em coluna QAE-Sephadex, que retém moléculas com cargas negativas, revelou perfis distintos para as duas espécies (figura 1). Para *A. myrcifolia* (figura 1A), a maior quantidade de carboidratos foi eluída com concentrações de 125 e 550 mM de imidazol e de ácidos urônicos também em 550 mM. Para o autoclavado de *R. jasminoides*, pequena quantidade de açúcares não foi retida pela matriz do gel ou foi eluída com tampão de baixa força iônica (imidazol 125 mM) (figura 1B). Os ácidos urônicos foram eluídos principalmente nas concentrações de 750 mM e 1 M de imidazol. Considerando-se as quantidades de carboidratos recuperadas após aplicação na coluna de troca iônica, os resultados obtidos sugerem que a eluição com imidazol 1 M foi suficiente para a retirada das moléculas presas mais fortemente à matriz do gel, não sendo necessária a utilização de maior força iônica.

As frações da coluna de troca iônica que continham maiores teores de carboidratos e ácidos urônicos foram reunidas conforme indicado na figura 1, dialisadas para a eliminação do sal e ensaiadas em cotilédones de soja para avaliação da atividade indutora de fitoalexinas (tabela 2). Para *A. myrcifolia*, a atividade indutora foi estatisticamente diferente do controle apenas nas frações III e IV eluídas com 750 mM e 1 M de imidazol, respectivamente. Para *R. jasminoides*, a atividade indutora de fitoalexinas ficou distribuída entre as frações eluídas da coluna, sendo as mais ativas aquelas com fraca interação com

a matriz do gel (125 mM) e aquelas liberadas pelo uso de 1 M de imidazol. Resultados similares foram encontrados em hidrolisados de paredes celulares de soja, onde também foi detectada atividade eliciadora da síntese de fitoalexinas nas frações eluídas juntamente com açúcares neutros com 125 mM de imidazol (Nothnagel *et al.* 1983). Para as duas

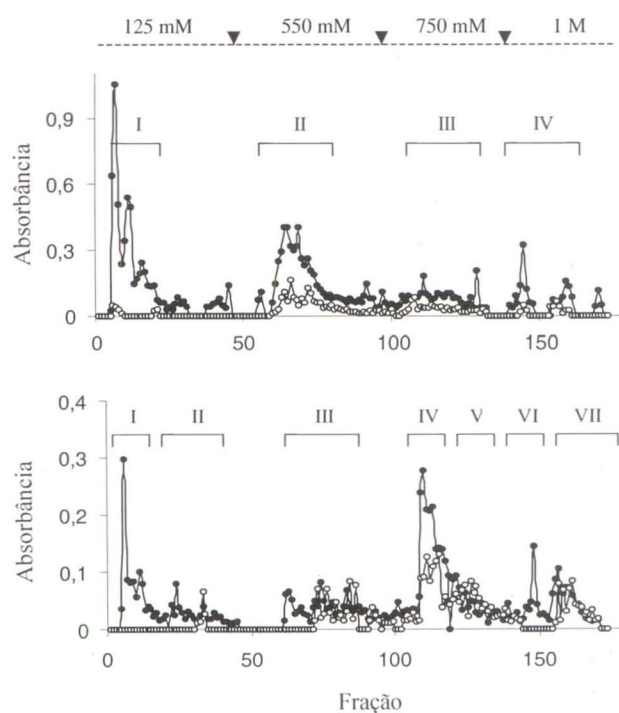


Figura 1. Perfil de eluição de autoclavados de paredes celulares de folhas de *Alibertia myrcifolia* (A) e *Rudgea jasminoides* (B) após cromatografia em coluna de troca iônica QAE-Sephadex em gradiente não linear de tampão imidazol (125 mM a 1 M). Aliquotas de cada fração foram ensaiadas para açúcares neutros (●) e para ácidos urônicos (○) e as mesmas reunidas conforme indicado pelos algarismos romanos.

Tabela 2. Atividade indutora de fitoalexinas em soja dos autoclavados de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides*, após fracionamento em coluna de troca iônica.

Amostras	Atividade indutora de fitoalexinas		
	(μ moles gliceolina /cotilédone)**	A/Amáx.***	
Elicidor de <i>M. ramosissimus</i>	120,8 \pm 12,7	A	1,00
Controle (água destilada)	31,8 \pm 3,2	B	0,26
<i>A. myrcifolia</i> *			
Fração I (125 mM)	54,2 \pm 17,4	BC	0,45
Fração II (550 mM)	42,6 \pm 4,0	BC	0,35
Fração III (750 mM)	73,5 \pm 5,2	CD	0,61
Fração IV (1 M)	99,0 \pm 15,9	ADE	0,82
<i>R. jasminoides</i> *			
Fração I (125 mM)	576,3 \pm 63,9	F	4,78
Fração II (125 mM)	417,0 \pm 112,8	F	3,45
Fração III (550 mM)	101,7 \pm 23,5	AD	0,84
Fração IV (750 mM)	64,4 \pm 11,8	BC	0,53
Fração V (750 mM)	93,1 \pm 10,2	ADE	0,77
Fração VI (1 M)	93,0 \pm 0,7	ADE	0,77
Fração VII (1 M)	1.457,7 \pm 264,3	G	12,07

* foram aplicados 25 μ g em equivalentes em carboidrato (açúcares neutros + ácidos urônicos) por cotilédone; ** médias de 3 determinações e *** = atividade dividida pelo valor do eliciador de *M. ramosissimus*, conforme descrito em Material e métodos. Letras iguais não diferem significativamente a Tukey 1%.

espécies de Rubiaceae aqui estudadas, maior atividade indutora foi detectada no material fortemente retido pelo gel (frações IV e VII, para *A. myrcifolia* e *R. jasminoides*, respectivamente), constituído possivelmente por oligogalacturonídeos resultantes da hidrólise de homogalacturonanos, polissacarídeos constituintes da fração pécica da parede celular. Entretanto, essa atividade foi maior nas frações de *R. jasminoides*, rubiácea que responde com a produção de fitoalexinas quando inoculada por fungos, quando comparada a *A. myrcifolia*, espécie na qual este tipo de resposta de defesa não é observado (Braga *et al.* 1991, Cordeiro Neto & Dietrich 1992).

É importante ressaltar que na tabela 2 o valor mostrado para a fração VII de *R. jasminoides* representa a atividade calculada caso 25 μ g em equivalentes de açúcares neutros + ácidos urônicos tivessem sido aplicados em cada cotilédone. Essa fração possuía quantidade muito menor de carboidratos e esse cálculo normalizado foi feito para possibilitar a comparação de atividade eliciadora entre as diferentes frações. A atividade biológica obedece a uma curva dose-resposta, que varia em função do log da concentração do eliciador e que apresenta

saturação. Assim o valor em questão é potencial, pois a aplicação de 25 μ g da fração VII de *R. jasminoides* certamente não levaria à produção de 1.457,7 μ moles de gliceolina, considerando-se o limiar de saturação do ensaio.

Nothnagel *et al.* (1983) demonstraram que hidrolisados de paredes celulares de hastes de soja (*Glycine max* L. Merr.) ou de pectina de *Citrus* continham oligogalacturonídeos que eram facilmente isolados por coluna de troca iônica em gel de QAE-Sephadex. A eluição com tampão de alta força iônica (750 mM) resultou na liberação de oligogalacturonídeos de grau de polimerização (GP) \geq 12. É interessante notar que pelo perfil cromatográfico apresentado na figura 1B, as frações que foram reunidas no pico I de *R. jasminoides* parecem não possuir ácidos urônicos ou contê-los em quantidades não detectadas pelo método colorimétrico utilizado. Entretanto, este pico apresentou a segunda maior atividade indutora de fitoalexinas, sugerindo que outras moléculas além dos oligogalacturonídeos podem exibir essa atividade. Alguns trabalhos registram que polímeros hemicelulósicos da parede celular, que contêm arabinose e/ou xilose, podem originar fragmentos indutores de respostas de defesa em plantas de arroz, milho e tomate (Bucheli *et al.* 1990, Aldington & Fry 1992).

Para *A. myrcifolia*, a maior atividade indutora de fitoalexinas foi detectada nas frações que apresentaram maior proporção de ácidos urônicos (tabela 3). Para *R. jasminoides*, esse fato não foi observado, uma vez que as frações mais ativas I, II e VII foram aquelas que apresentaram ausência ou baixo conteúdo de ácidos urônicos, respectivamente.

A análise da composição das frações em monossacarídeos neutros por HPAEC/PAD não revelou padrão que pudesse ser associado à atividade indutora detectada (tabela 3). Para *A. myrcifolia*, arabinose foi o açúcar predominante nas frações ativas, indicando hidrólise da fração pécica da parede celular pelo processo de autoclavagem. Para *R. jasminoides*, a fração I eluída com 125 mM de imidazol mostrou alta proporção de arabinose e galactose, denotando a quebra preferencial de polissacarídeos pécticos neutros do tipo arabinogalactanos. A fração VII eluída com alta força iônica revelou a presença de alta proporção de glucose, xilose e galactose, sugerindo predomínio de componentes de polissacarídeos hemicelulósicos. Braga & Dietrich (1998), após fracionamento dos autoclavados em

Tabela 3. Proporção de monossacarídeos neutros obtida por HPAEC/PAD e de ácidos urônicos nos picos das frações obtidas de autoclavados de paredes celulares de folhas de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* após fracionamento em coluna de troca iônica em gel de QAE-Sephadex. Ram = ramnose; Ara = arabinose; Gal = galactose; Glc = glucose e Xil/Man = xilose/manose.

Espécie/fração	% molar					
	Ác. urônicos	Ram	Ara	Gal	Glc	Xil/Man
<i>A. myrcifolia</i>						
Fração I (125 mM)	15,8	tr	34,2	17,6	17,3	14,9
Fração II (550 mM)	38,4	2,3	19,2	11,4	4,0	24,7
Fração III (750 mM)	58,3	2,9	13,2	10,2	7,4	8,0
Fração IV (1 M)	51,7	1,6	13,6	8,6	12,6	11,7
<i>R. jasminoides</i>						
Fração I (125 mM)	-	-	33,0	35,0	14,2	17,7
Fração II (125 mM)	-	21,6	25,5	32,5	8,6	11,6
Fração III (550 mM)	45,9	7,5	16,8	15,6	5,3	8,9
Fração IV (750 mM)	39,2	-	22,6	26,2	6,8	5,2
Fração V (750 mM)	61,2	-	13,0	8,8	12,9	13,9
Fração VI (1 M)	52,8	0,3	3,7	6,3	29,7	7,2
Fração VII (1 M)	21,9	-	8,6	13,7	35,8	19,9

tr = traços; - = não detectado

colunas de peneira molecular Sephadex G-25 e G-100, encontraram arabinose e glucose como monossacarídeos predominantes nas frações com alta atividade eliciadora, embora glucose tenha sido observada em proporção relativa muito maior em *R. jasminoides*, o que está de acordo com os resultados aqui mostrados para a fração VII dessa espécie (tabela 3). Embora a autoclavagem promova principalmente a solubilização de polissacarídeos pécicos (Fry 1988), a presença de grande quantidade de glucose nas frações indica que fragmentos de polissacarídeos de outros domínios da parede celular também foram liberados por esse procedimento.

A presença de oligogalacturonídeos nas frações reunidas da coluna de QAE-Sephadex (figura 1) foi analisada através de cromatografia líquida de alta eficiência (figura 2). Para *A. myrcifolia*, oligogalacturonídeos foram encontrados nas frações II e III, mas não na IV que apresentou maior atividade indutora da síntese de fitoalexinas (tabela 2). Para *R. jasminoides*, esses oligômeros foram detectados nas frações III e IV e em menor quantidade na fração V, não coincidindo com maior atividade indutora observada (frações I e VII), porém correspondendo a algumas das frações com altos teores de ácidos urônicos quantificados nos ensaios colorimétricos. Assim, não

foi possível correlacionar a presença de oligogalacturonídeos com a atividade indutora de fitoalexinas observada nos cotilédones de soja. Isso sugere que ou oligogalacturonídeos ativos estão presentes em quantidades pequenas nessas frações, abaixo do limite de detecção do método cromatográfico utilizado, ou que fragmentos diferentes são responsáveis pela atividade indutora de fitoalexinas observada. Recentemente, foi demonstrado que oligogalacturonídeos de pequeno grau de polimerização inibem respostas de resistência a patógenos em plantas de trigo (Moerschbacher *et al.* 1999) e que esses oligômeros parecem suprimir a atividade indutora da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja promovida por oligogalacturonídeos com GP>12 (dados não publicados). Isso poderia explicar o fato de se detectar a presença de oligogalacturonídeos nas frações II de *A. myrcifolia* e IV e V de *R. jasminoides* da coluna de QAE-Sephadex, mas a atividade indutora das mesmas estar ausente ou não ser tão pronunciada.

Com o objetivo de verificar se a atividade indutora de fitoalexinas estaria relacionada à presença de oligogalacturonídeos, os autoclavados foram novamente aplicados à coluna de troca iônica, sendo a eluição do material da coluna feita apenas com

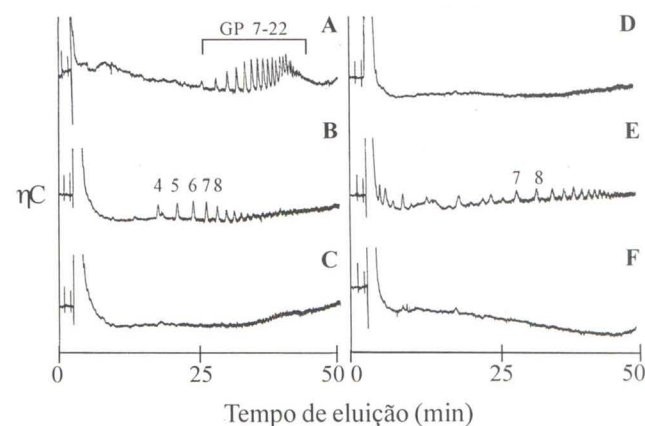


Figura 2. Perfil de eluição de oligogalacturonídeos por HPAEC/PAD de padrão de oligômeros com grau de polimerização 7 a 22 (A), das frações III (B) e IV (C) de *Alibertia myrcifolia* e das frações I (D), III (E) e VII (F) de *Rudgea jasminoides* reunidas de acordo com perfil mostrado em coluna de QAE-Sephadex (figura 1). Os números mostrados sobre alguns picos nos cromatogramas indicam o grau de polimerização dos oligogalacturonídeos. Os perfis das frações I e II de *A. myrcifolia* foram similares àqueles mostrados em C e B, respectivamente; para *R. jasminoides* as frações IV e V foram similares ao perfil mostrado em E e as II e VI ao perfil de F, motivo pelos quais esses perfis não são mostrados na figura.

125 mM e 1 M de imidazol, de modo a separar o material que não interagiu com a matriz do gel da coluna daquele que, por possuir carga negativa, ficou ligado a ela. Esse material foi tratado exaustivamente com endopoligalacturonase (Endo-PG), pectinase capaz de hidrolisar polissacarídeos e oligossacarídeos de homogalacturonanos, por oito horas. Esse período corresponde ao dobro do tempo utilizado por Nothnagel *et al.* (1983) para abolir completamente a atividade de oligogalacturonídeos isolados de paredes celulares de soja e também fracionados em coluna de QAE-Sephadex. Paredes celulares brutas de *R. jasminoides* foram utilizadas para garantir que a enzima apresentava a atividade hidrolítica esperada (Braga & Dietrich 1998) (tabela 4).

As atividades indutoras das frações brutas eluídas da segunda coluna de QAE-Sephadex (tabela 4) mostram, ao contrário dos dados da tabela 2, maiores valores no material não ligado a matriz (125 mM) quando comparados ao de 1 M, para ambas as espécies. Isso decorre possivelmente do fato de ter havido diluição dessa atividade, pela reunião, em uma única fração, de material com pouca atividade indutora. Além disso, para *A. myrcifolia* a maior atividade na fração de 125 mM pode ser explicada pela inclusão de material eluído nessa concentração de tampão imidazol que havia sido desconsiderado na análise anterior (frações 25-50). Apesar dessas diferenças, *R. jasminoides* continua apresentando atividade eliciadora da síntese de fitoalexinas bastante superior a *A. myrcifolia*, o que está de acordo com os resultados da tabela 2.

De modo geral, o tratamento desse material com Endo-PG resultou em perda de 4 a 31% da atividade indutora inicial, indicando que os oligômeros de pectina parecem contribuir apenas em parte para a atividade biológica detectada nos autoclavados das paredes celulares dessas espécies (tabela 4). A fração 125 mM de *A. myrcifolia* apresentou redução de atividade exatamente correspondente ao seu teor em açúcares ácidos que foi calculado como 20,3% do total de carboidrato. A fração 1 M de *A. myrcifolia*, embora contenha cerca de 50% de seu conteúdo em ácidos urônicos, praticamente não foi hidrolisada. Experimentos realizados por Braga & Dietrich (1998) demonstraram que paredes celulares de *R. jasminoides* são hidrolisadas pela Endo-PG, liberando oligômeros ativos em cotilédones de soja, fato não observado para *A. myrcifolia*. Recentemente, Silva & Braga (dados não publicados) relacionaram

essa ausência de hidrólise em *A. myrcifolia* ao alto grau de metilesterificação de sua pectina, o que impede a ação da Endo-PG, conforme já reportado por outros autores para outras espécies vegetais (Sakai *et al.* 1993, Willats *et al.* 2001). Assim, a presença de fragmentos de pectina metilesterificados poderia explicar a pequena redução na atividade indutora observadas para *A. myrcifolia* na fração 1 M (tabela 4) após o tratamento com Endo-PG.

Para *R. jasminoides*, o tratamento da fração 125 mM em Endo-PG revelou a existência de cerca de 34% de ácidos urônicos na mesma, os quais não tinham sido quantificados anteriormente pelo ensaio colorimétrico utilizado, possivelmente pelo fato dos mesmos fazerem parte de estruturas maiores onde havia predomínio de açúcares neutros. Essa sugestão é reforçada pela ausência de interação desse material com a matriz da coluna de QAE-Sephadex. A fração 1 M dessa espécie, com 54,3% de ácidos urônicos, teve sua atividade reduzida em apenas 28% após o tratamento com Endo-PG (tabela 4).

Tabela 4. Atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja de autoclavados de paredes celulares de *Alibertia myrcifolia* e *Rudgea jasminoides* em frações da coluna de troca iônica eluídas em gradiente não linear de imidazol 125 mM e 1 M antes (bruto) e após tratamento com endopoligalacturonase (Endo-PG) Megazyme por oito horas.

Amostras	Atividade indutora de fitoalexinas*			
	(μmoles glicocolina /cotilédone)**		A/Amáx.***	
	bruto	c/Endo-PG	bruto	c/Endo-PG
Eliciator de				
<i>M. ramosissimus</i>	119,0	–	1,00	–
Controle (tampão)	51,4	–	0,43	–
<i>A. myrcifolia</i> *				
Fração 125 mM	112,5	90,0 (20%)	0,94	0,76
Fração 1 M	50,1	48,2 (4%)	0,42	0,40
<i>R. jasminoides</i> *				
Fração 125 mM	184,4	127,2 (31%)	1,55	1,07
Fração 1 M	135,8	97,6 (28%)	1,14	0,82
Parede celular ***	51,3	89,6	0,43	0,75

* Foram aplicados cerca de 50 μg em equivalentes em carboidratos (açúcares neutros + ácidos urônicos) por cotilédone. **A/Amáx = Atividade dividida pelo valor obtido com a eliciação de autoclavados de *Mucor ramosissimus*. *** Parede celular de *R. jasminoides* utilizada como controle da hidrólise. Valores entre parênteses representam % de redução da atividade após o tratamento com Endo-PG. - não avaliado.

A análise das frações antes e após a hidrólise com Endo-PG por HPAEC/PAD não revelou diferenças marcantes nos perfis de oligogalacturonídeos, os quais foram detectados nas frações eluídas com 1 M de imidazol para ambas as espécies (resultados não mostrados).

Conforme demonstrado por vários autores, procedimentos distintos tais como hidrólises ácida (Hahn *et al.* 1981, Nothnagel *et al.* 1983) e enzimática (Bucheli *et al.* 1990) e autoclavagem (Braga & Dietrich 1998) têm sido empregados para a obtenção de oligossacarídeos com atividade biológica a partir de paredes celulares vegetais. A maioria dessas moléculas ativas isoladas de paredes celulares de plantas superiores é de natureza pectica, sendo similares em tamanho e estrutura. Entretanto, trabalhos de outros autores (Bucheli *et al.* 1990, Aldington & Fry 1992), os dados obtidos por Braga & Dietrich (1998) e os resultados aqui apresentados fortemente sugerem a existência de moléculas eliciadoras diferentes de oligogalacturonídeos com atividade biológica similar a eles. Lisková *et al.* (1995) descreveram a presença de atividade biológica em fragmentos de galactoglucomanano obtidos de *Populus monilifera*.

No caso das rubiáceas em questão, embora oligogalacturonídeos estejam contribuindo para a atividade indutora de fitoalexinas observada, as duas espécies analisadas apresentam comportamentos distintos com relação a essa atividade, o que deve ser consequência das diferenças em estrutura e composição de suas paredes celulares conforme anteriormente relatado por Braga & Dietrich (1998) e Braga *et al.* (1998).

Em conjunto, esses resultados sugerem que moléculas indutoras da síntese de fitoalexinas, por serem parte integrante de polissacarídeos da parede celular vegetal, estão presentes em *A. myrcifolia* e *R. jasminoides* e, provavelmente, na grande maioria das espécies vegetais, independente de sua capacidade de sintetizar esses compostos de defesa e com natureza química e atividade variáveis de acordo com a planta utilizada em sua obtenção. É importante ressaltar que métodos como autoclavagem e hidrólise ácida são condições artificiais de obtenção dessas moléculas, sendo úteis para a análise da ocorrência desses fragmentos ativos e para comparação de suas características químicas, mas não para a compreensão dos processos que ocorrem *in vivo*. A liberação de fragmentos de parede celular com atividade indutora

de respostas de defesa ocorre durante as interações planta-patógeno por ação de hidrolases microbianas e da própria planta, entre as quais estão incluídas, além das pectinases, outras glicosidades responsáveis pela quebra polissacarídeos hemicelulósicos da parede celular da planta hospedeira. A detecção de outros fragmentos indutores de fitoalexinas, além dos oligogalacturonídeos, sugere que os mesmos devam participar das respostas de defesa desencadeadas durante as interações entre plantas e microorganismos, porém os mecanismos responsáveis por sua liberação e seu envolvimento nos eventos que ocorrem *in vivo* ainda são desconhecidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra Sonia Machado de Campos Dietrich pelas valiosas sugestões durante a redação do trabalho, ao CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica-PIBIC a E.S. Xavier, de Aperfeiçoamento a C.A. Silva e F. Moraes e de Produtividade em Pesquisa a M.R. Braga e à FAPESP pelo auxílio financeiro dentro do Programa BIOTASP (processo 98/05124-8).

Literatura citada

- Aldington, S. & Fry, S.C. 1992. Plant cell wall-lysing enzymes in the apoplast of tomato leaves infected with *Fulvia fulva*. Canadian Journal of Botany 70: 607-613.
- Alghisi, P. & Favaron, F. 1995. Pectin degrading enzymes and plant-parasite interactions. European Journal of Plant Pathology 101: 365-375.
- Ayers, A., Ebel, J., Finelli, F., Berger, N. & Albersheim, P. 1976. Host-Pathogen Interactions IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Physiology 57: 751-759.
- Braga, M.R. & Dietrich, S.M.C. 1998. Phytoalexin-inducing oligosaccharins from the cell walls of tropical Rubiaceae. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10: 79-84.
- Braga, M.R., Young, M.C.M., Ponte, J.V.A., Dietrich, S.M.C., Emerenciano, V.P. & Gottlieb, O.R. 1986. Phytoalexin induction in plants of tropical environment. Biochemical, Systematics and Ecology 14: 507-514.
- Braga, M.R., Young, M.C.M., Dietrich, S.M.C. & Gottlieb, O.R. 1991. Phytoalexin induction in Rubiaceae. Journal of Chemical Ecology 17: 1079-1090.
- Braga, M.R., Bom Pessoni, R.A. & Dietrich, S.M.C. 1998. Cell wall polysaccharide composition of leaves of tropical Rubiaceae differing in phytoalexin response. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10: 71-78.

- Bucheli, P., Doares, S.H., Albersheim, P. & Darvill, A.** 1990. Host-Pathogen Interactions. XXIII. Partial purification of heat-labile molecules secreted by rice blast pathogen that solubilize plant cell fragments (oligosaccharides) that kill plant cell. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 159-173.
- Cervone, F., De Lorenzo, G., Degrá, L., Salvi, G. & Bergami, M.** 1987. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 85: 631-637.
- Cervone, F., De Lorenzo, G., Salvi, G., Bergmann, C., Hahn, M.G., Ito, Y., Darvill, A. & Albersheim, P.** 1989. Release of phytoalexin elicitor-activity oligogalacturonides by microbial pectic enzymes. *In*: B.J.J. Lutgtenberg (ed.). Signal molecules in plants and plant-microbe interactions. NATO ASI Series, vol. H36. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 85-89.
- Cordeiro Neto, F. & Dietrich, S.M.C.** 1992. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. *Ciência e Cultura* 44: 342-344.
- Côté, F. & Hahn, M.G.** 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26: 1379-1411.
- Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G. & Albersheim, P.** 1984. Host-Pathogen Interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell fragments. *Plant Physiology* 68: 221-228.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- Filizetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157-162.
- Fry, S.C.** 1988. *The Growing Plant Cell Wall: chemical and metabolic analysis*. Longman, New York, 333 p.
- Hahn, M.G., Darvill, A. & Albersheim, P.** 1981. Host-Pathogen Interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology* 68: 1161-1169.
- Hahn, M.G., Bucheli, P., Cervone, F., Doares, S.H., O'Neill, R.A., Darvill, A.G. & Albersheim, P.** 1989. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. *In*: T. Kosuge & E.W. Nester (eds.). *Plant-Microbe Interactions*, v.3. Molecular and genetic perspectives. McGraw-Hill Inc., New York, pp. 131-181.
- Harborne, J.B.** 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical, Systematics and Ecology* 27: 335-367.
- Hargreaves, J.A. & Bailey, J.A.** 1978. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. *Physiological Plant Pathology* 13: 89-100.
- Lisková, D., Auxtová, O., Kákoniová, M., Karácsonyi, S. & Bilisics, L.** 1995. Biological activity of galactoglucomannan-derived oligosaccharides. *Planta* 196: 425-429.
- Moerschbacher, B.M., Mierau, M., Graebner, B., Noll, U. & Mort, A.J.** 1999. Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany* 50: 605-612.
- Nothnagel, E.A., McNeil, M. & Dell, A.** 1983. Host-Pathogen Interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell wall elicits phytoalexins. *Plant Physiology* 71: 916-926.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, E.J.** 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances and Applications in Microbiology* 39: 213-294.
- Smith, C.J.** 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist* 132: 1-45.
- Spiro, M.D., Kates, K.A., Koller, A.L., O'Neill, M.A., Albersheim, P. & Darvill, A.G.** 1993. Purification and characterization of biologically active 1,4-linked -D-oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 247: 9-20.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W. & Knox, P.** 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.

