

**CAREM GLEDES VARGAS RECHIA**

**OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANA DE SEMENTES DE  
*Hymenaea courbaril*: ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.**

**Tese apresentada ao Colegiado do  
Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal  
do Paraná, como requisito para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências.**

**CURITIBA  
1998**

CAREM GLEDES VARGAS RECHIA

OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Hymenaea courbaril*:  
ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



Dra. Fany Reicher - Orientadora  
Universidade Federal do Paraná



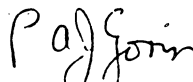
Dra. Eliane Barreto Bergter  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dra. Yara Michelacci  
Universidade Federal de São Paulo



Dra. Zuleika Rotschild  
Universidade de São Paulo



Dr. Philip Albert James Gorin  
Universidade Federal do Paraná

**ORIENTADORA: Profa. Dra. FANY REICHER**

**COORIENTADORA: Profa. Dra MARIA RITA SIERAKOWSKI**

**PARTE DESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO CENTRE DE  
RECHERCHES SUR LES MACROMOLECULES VEGETALES (CERMAV),  
GRENOBLE - FRANÇA, ORIENTADORES:**

**Dra. YVETTE LIENART**

**Dr. HUGUES DRIGUEZ**

*“O homem é aquilo em que acredita.”*

*(Anton Chekhov)*

*Ao meu irmão Claiton, pela amizade e confiança em todos os momentos.*

*Ao Erasmo pelo incentivo, dedicação e empenho para que meus objetivos fossem alcançados.*

*Ao meu filho, Giovani, cuja doçura, em muitos momentos, foi o estímulo necessário para não esmorecer.*

*Ao Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa (in  
memoriam) pelo exemplo de amor ao trabalho  
que serve-me de estímulo em todos os  
momentos.*

*À Profa. Dra. Fany Reicher toda a minha gratidão pelo exemplo de dedicação à ciência, à família e, principalmente, pela preocupação constante com minha formação, pelo estímulo e confiança com que me conduziu durante esta etapa.*

## *Agradecimentos*

*A Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski pela orientação, amizade e carinho fundamentais em todas etapas desta caminhada;*

*A profa. Dra. Zuleika Rothschild pelo incentivo e confiança em todos os momentos;*

*Aos Profs. Drs. do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP Augusto César Cropanese Spadaro, Carlos Curti, Ana Isabel de Assis Pandochi e Yara Lucisano Valim pelo apoio, pela amizade e pelo convívio tão gratificante;*

*Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica FCFRP-USP Alcides Silva Pereira, Ieda Maria Razaboni Prado, José Orestes Del Ciampo, Maria Regina Pila Raphaloski e Nadir Mazzucato pelo suporte técnico, amizade e pela agradável convivência;*

*À bióloga Ana Cristina Morseli Polizello e a farmacêutica Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini pela disponibilidade e dedicação com a qual apoiaram-me na preparação desta tese;*

*Aos estagiários Alexandre Kanashiro, Denise P. da S. Leitão, Cláudia Bueno Rocha, Camile Pizeta Semighini, Luciana Mariko Kabeya, Valéria Gomes Tudella e pós-graduandos, Acácio Antônio Pigo, Celene M. O. Simões Alves, Celma Gonçalves Duarte, Fábio Ermínio Mingatto, Maria Cecília Jordani Gomes, Sílvia Magaly Sasso Carvalho e Thiago Rodrigues, do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP pela convívio agradável e amizade;*

*Às doutorandas Cleni Mara Marzocchi Machado, Elisa Maria de Sousa Russo pela carinhosa acolhida e apoio reconfortante;*

*À todos os membros do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais o departamento de Bioquímica de Universidade Federal do Paraná pela colaboração e carinho de sempre;*

*À Profª. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pela atenção e colaboração;*

*À todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelo apoio;*

*À Dra. Yvette Liénart pela grande oportunidade de tê-la como orientadora em parte deste trabalho;*

*Ao Dr. Hugues Driguez pelas discussões sensatas e extremamente formativas;*

*Aos Drs. Silvain Cottaz e Alain Heyraud pelas discussões e orientações;*

*À todos os técnicos, funcionários do Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble, França, em especial a Catherine Gautier e Philippe Colin Morel pelo incansável apoio técnico e paciência;*

*Aos amigos Carmen, Marieta e Mihai pelo apoio, amizade e solidariedade que fizeram os dias de trabalho longe da minha Terra muito mais leves;*

*Aos amigos Emanuel, Luis Fernando, Selma e Sérgio pelo carinho e amizade inestimáveis;*

*À grande amiga Nice de Almeida pela solidariedade, incentivo e colaboração incansável, minha eterna gratidão;*

*Ao médico veterinário Luciano Trevisan Freitas pelo incentivo inestimável recebido para o início de minha carreira de pesquisa;*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido durante a execução deste trabalho;*

*À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

# ÍNDICE

## Lista de Abreviaturas

## Resumo

## Abstract

<b>I-Introdução</b> .....	1
1-Parede Celular de Plantas.....	2
2-Xiloglucanas.....	6
3- Interações Físicas da Xiloglucana na Parede Celular.....	10
4- Moléculas Sinalizadoras em Plantas.....	17
5- Oligossacarídeos Derivados de Xiloglucanas.....	23
6- Atividade $\alpha$ -L-Fucosidase.....	30
7- Descrição da <i>Hymenaea courbaril</i> .....	31
<b>II-Objetivos</b> .....	34
<b>III-Materiais e Métodos</b> .....	36
1-Métodos gerais.....	37
2-Materiais.....	38
3-Hidrólises ácidas totais.....	39
4-Obtenção das sementes.....	40
5-Obtenção dos polissacarídeos.....	40
6-Hidrólise enzimática da fração E <sub>III</sub> com celulase comercial.....	40
7-Hidrólise enzimática da fração E <sub>III</sub> com EGI.....	43
8-Hidrólise enzimática da fração E <sub>III</sub> com XG5.....	43
9-Cromatografia de gel permeação (GPC).....	43

10-Redução dos produtos de hidrólise enzimática.....	44
11-Isolamento dos oligossacarídeos por HPLC.....	44
12-Preparação da xiloglucana marcada por DIG.....	44
13-Preparação da neoglicoproteína XXLG~BSA .....	45
14-Teste de crescimento de coleótilos de trigo.....	45
15-Preparação de células e protoplastos de <i>Rubus fruticosus</i> .....	47
15.1- contagem e viabilidade.....	49
16-Bioensaios.....	49
17-Preparação da fração microsomal.....	50
18-Extração das proteínas da membrana.....	50
19-Determinação das atividades glicohidrolases.....	50
19.1-Extração e dosagem das proteínas.....	50
19.2-Ensaio das glicohidrolases.....	51
20-Dosagem XET.....	53
<b>IV- Resultados e Discussão.....</b>	<b>55</b>
1-Obtenção dos polissacarídeos.....	56
2-Obtenção dos oligossacarídeos.....	61
3-Atividade biológica dos oligossacarídeos de xiloglucana.....	83
3.1-Teste de crescimento de coleótilos de trigo.....	83
3.2-Indução das atividades hidrolases em protoplastos e células de <i>Rubus fruticosus</i> .....	86
3.3-Dose dependência $\alpha$ -D-xilosidase e $\beta$ -D-xilosidase.....	90
3.4-Modulação da atividade $\beta$ -1,4-glucanase.....	93
3.5-Atividade XET em protoplastos de <i>R. fruticosus</i> .....	93
3.6-Efeito do ácido salicílico sobre a indução $\alpha$ -L-fucosidase.....	97
3.7-Modulação da atividade $\alpha$ -L-fucosidase.....	98

3.8-Efeito dos oligossacarídeos de xiloglucana na resposta $\alpha$ -L-fucosidase induzida por 2,4-D e GA <sub>3</sub> .....	103
<b>VI-Referências Bibliográficas.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO 1- Publicações.....</b>	<b>131</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABSF	fluoreto de 4-(2-aminoetil)-sulfonil-benzeno
AG	ácido galacturônico
Bis-tris	[bis (2-hidroxietil) iminotris (hidroximetil)]-metano
BSA	albumina de soro bovino
CG	cromatografia líquido-gasosa
CHAPS	3-[(3 cloramidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato
DIG	digoxigenina
DMF	dimetil formamida
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGI	endoglucanase do tipo I
EGTA	ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético
FAB-MS	fast atom bombardment-mass spectroscopy
FAL	fenilalanina amônia liase
Ficcol	polímero sintético de sacarose de massa molecular de 400.000
GA	giberelinas
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
GLC-MS	cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa
GP	grau de polimerização
IAA	ácido 3-indol-acético
IgG	imunoglobulina da classe G
M	massa do oligossacarídeo
PBS	salina tamponada com fosfato
Rd	rendimento
RG II	ramnogalacturonana do tipo II

RMN- <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de próton e de carbono-13.
SDS	dodecil sulfato de sódio
TFA	ácido trifluoracético
Tr	tempo de retenção
tr	traços
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
XET	xiloglucana endotransglicosilase
XG~DIG	polímero de xiloglucana ligada à DIG
XG5	endoxiloglucanase II
XXLG~BSA	neoglicoproteína do oligômero XXLG ligada à BSA

**RESUMO**

O endosperma das sementes de *Hymenaea courbaril* contém uma xiloglucana (relação Glu:Xil:Gal de 4,5:3:1) com rendimento de ~85% em relação ao endosperma seco, cuja estrutura é formada por uma cadeia principal de  $\beta$ -D-glucana ligada (1 $\rightarrow$ 4) tendo cadeias laterais formadas por unidades de  $\alpha$ -D-xilopiranosil e  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-xilopiranosil, ligadas (1 $\rightarrow$ 6) a cadeia principal. A xiloglucana foi tratada com uma endo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanase obtida de *Humicola insolens* (EGI) e com a endoxiloglucanase obtida de *A. aculeata* (XG5), obtendo-se uma série de oligossacarídeos, os quais foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub>. Estes oligossacarídeos foram isolados por HPLC, caracterizados por espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e FAB-MS, sendo os principais o octassacarídeo (XXLGol) e o heptassacarídeo (XXXGol), com os quais determinou-se as atividades biológicas, paralelamente a outras estruturas relacionadas com a xiloglucana.

A atividade auxínica do XXLGol, *in vivo*, foi analisada usando-se coleóptilos de trigo. O XXLGol promoveu crescimento independente da presença de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Na presença de 2,4-D, XXLGol, em concentração nanomolar, aumentou a resposta induzida por auxina. Analisou-se também, o efeito dos oligossacarídeos de xiloglucana na indução de glicohidrolases em células e/ou protoplastos de *Rubus fruticosus*. As respostas mais significativas foram obtidas para as atividades  $\alpha$ -D-xilosidase,  $\beta$ -D-xilosidase, (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanase e  $\alpha$ -L-fucosidase. Esta última foi analisada com maior atenção, verificando-se que o XXLGol, em concentração nanomolar, causa um rápido aumento da resposta  $\alpha$ -L-fucosidase e modula a resposta  $\alpha$ -L-fucosidase induzida por 2,4-D e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). As atividades biológicas dependem principalmente dos aspectos estruturais e das concentrações dos oligossacarídeos de xiloglucana utilizados e da estrutura do hormônio adicionado. Os resultados sugerem a presença de um sistema de reconhecimento específico para oligômeros de xiloglucana em plantas.

**ABSTRACT**

The seeds of *Hymenaea courbaril* contain a xyloglucan (yield 85%) whose structure consists of a cellulosic type (1→4)-linked β-D-glucan main-chain with side chains containing α-D-xylopyranosyl and β-D-galactopyranosyl-(1→2)-α-D-xylopyranosyl residues, each (1→6) linked to the main chain (Glc:Xyl:Gal = 4,5:3:1). The polysaccharide was treated with the endo-1,4-β-D-glucanase from *Humicola insolens* (EGI) and the endo-xyloglucanase from *A. aculeata* (XG5), giving rise a number of oligosaccharides (which were reduced with NaBH<sub>4</sub>) mainly octasaccharide (XXLGol) and heptasaccharide (XXXGol). The oligosaccharides were isolated by HPLC and characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and FAB-MS and examined in terms of their biological activity in parallel with other structurally related xyloglucan compounds.

The auxin activity of XXLGol *in vivo*, was investigated using wheat coleoptiles. The octasaccharide promoted growth independently of the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In the presence of 2,4-D, XXLGol, at nanomolar concentrations, increased the auxin-induced response. In addition, a system of *Rubus fruticosus* protoplasts or cells was used to study the signaling effect of the induction of glycohydrolases. Significant responses were found for α-D-xylosidase, β-D-xylosidase, β-1,4-glucanase and α-L-fucosidase. The α-L-fucosidase induction was analyzed in more detail and it was found that XXLGol is a signaling molecule, since it has the ability to induce, at nanomolar concentrations, a rapid increase in an α-L-fucosidase response and to modulate 2,4-D or gibberillic acid-induced α-L-fucosidase. The biological responses depended mainly on the structural features of the xyloglucosyl oligomers, the sugar concentration and the structure of the hormone added. The results suggest the presence of specific recognition systems for xyloglucan oligomers in plants.

## **I-INTRODUÇÃO**

## 1-PAREDE CELULAR DE PLANTAS

Foram propostos vários modelos para as transformações ocorridas durante a expansão da parede celular primária induzida por auxina. Os mais antigos sugeriam que as paredes seriam como linhas simples, como apresentado em duas hipóteses de expansão celular induzida por auxina. No modelo do “alastramento químico” ou de transglicosilação, as ligações entre as moléculas de fixação seriam clivadas e transferidas para novas associações. No modelo de hidrólise, as moléculas suporte seriam clivadas e as microfibrilas religadas por novas ligações cruzadas (Cleland, 1981).

O grupo de Albersheim foi o primeiro a apresentar, de maneira conjunta, os diferentes componentes conhecidos de parede, isto é, celulose, hemiceluloses, pectina e proteínas como elementos associados, estabelecendo um modelo básico para a parede celular (Keegstra *et al.*, 1973; Albersheim, 1975).

Carpita e Gibeaut (1993) elaboraram propostas estruturais de 2 tipos para paredes celulares primárias de plantas angiospermas. A primeira engloba as paredes de dicotiledôneas em geral e algumas paredes de monocotiledôneas, sendo chamadas paredes de tipo I (Fig. 1). A segunda inclui a parede de Poáceas, abriga a maior parte das famílias de monocotiledôneas, são chamadas nesse caso de paredes de tipo II.

A parede do tipo I é composta por uma rede de fibras de celulose, formadas por microfibrilas de 5-15 nm de largura e espaçadas de 20-40 nm, enoveladas como uma bobina. As fibras de celulose são entrelaçadas, basicamente, pelas cadeias de xiloglucanas. Esta rede formada entre xiloglucana-celulose é considerada o principal sistema de controle da expansão celular. Pode-se encontrar outros tipos de polissacarídeos hemicelulósicos como gluco- e galactoglucomananas, galactomananas, (1→3)-β-D-glucanas e glucuronoarabinoxilanas, porém em menor quantidade. Estes polissacarídeos podem ser encontrados em maior quantidade nas paredes espessas do endosperma e cotilédone de

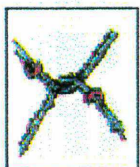
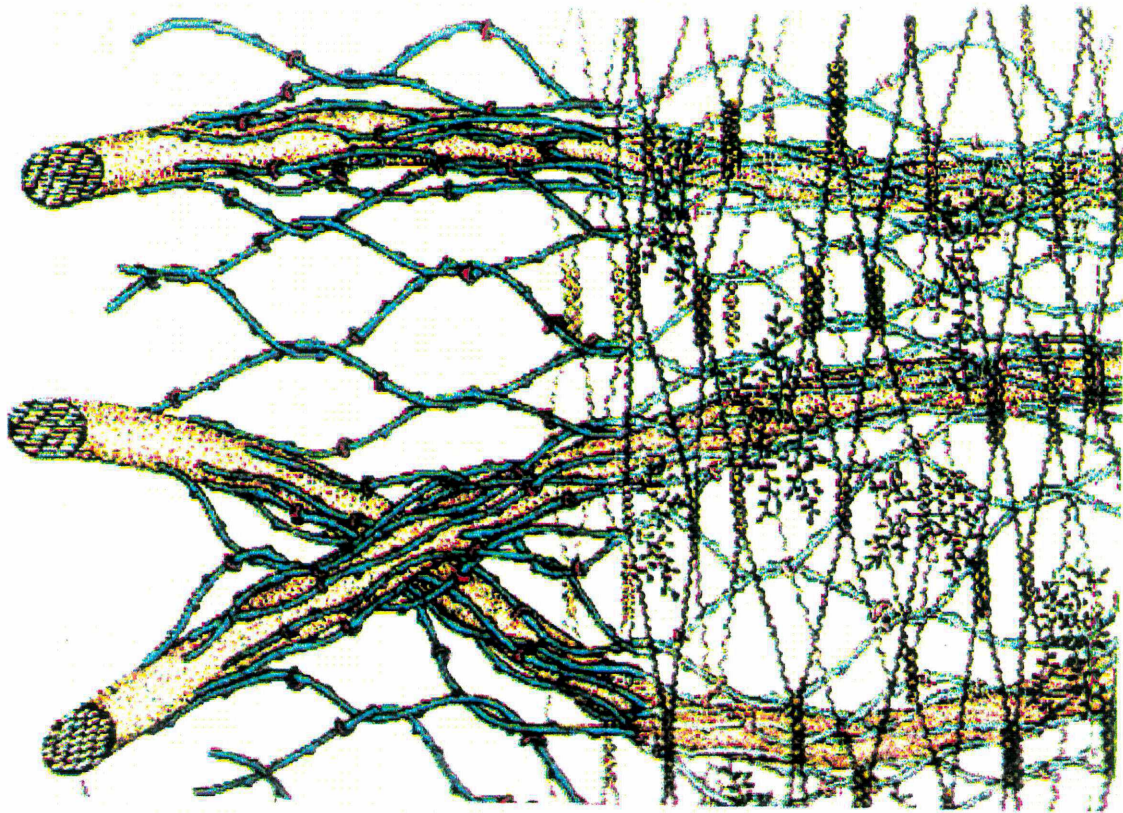
algumas sementes (Carpita e Gibeaut, 1993; Zablackis *et al.*, 1995).

A celulose e as hemiceluloses estão embebidas em uma matriz de pectina. A pectina é formada fundamentalmente por homopoligalacturonanas e ramnogalacturonanas do tipo I, que nestas estruturas, estabelecem ligações cruzadas via cálcio formando um gel rígido insolúvel. Na parede celular do tipo I, raramente encontra-se ramnogalacturonanas do tipo II. Este modelo tornou-se completo pela incorporação de uma glicoproteína rica em hidroxiprolina chamada extensina (Keegstra *et al.*, 1973).

A parede celular primária do tipo II é composta pelas microfibrilas de celulose, porém, estas são interligadas por cadeias de glucuronoarabinoxilanas. Encontra-se também pectina formada por ácido poligalacturônico e ramnogalacturonana I, com cadeias laterais de arabinogalactanas. A extensina está ausente nesta estrutura tendo-se uma proteína rica em treonina (Carpita e Gibeaut, 1993).

Durante a expansão celular, a parede celular é um compartimento metabolicamente ativo. Os interlaces entre as moléculas são clivados enzimaticamente e a pressão osmótica impulsiona o distanciamento dos componentes fibrilares. Novas microfibrilas e associações entre os polímeros são estabelecidas no interior da superfície da parede, formando uma estrutura estratificada e com muitas ligações cruzadas (Wessels, 1986).

No modelo de Keegstra *et al.* (1973), todas as hemiceluloses estão ligadas covalentemente, exceto as xiloglucanas. Estas são ligadas às microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio. Os autores propuseram que a expansão induzida por ácido não requer a hidrólise das ligações covalentes, mas simplesmente a dissociação temporária das pontes de hidrogênio. Esta hipótese foi descartada no momento que Valent e Albersheim (1974) verificaram que as ligações de ponte de hidrogênio são fortalecidas em pH ácido.



XILOGLUCANA



ZONA DE JUNÇÃO  
COM ÁCIDO POLI-  
GALACTURÔNICO



RAMNOGALACTURONANA I  
COM CADEIAS LATERAIS DE  
ARABINOGALACTANA

FIGURA 1- MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I (Carpita e Gibeaut, 1993)

Os modelos sugeridos por Cleland (1981) e Keegstra *et al.* (1973) ilustraram os possíveis mecanismos de crescimento, porém não avaliaram as direções que as microfibrilas tomam umas em relação às outras, durante a expansão celular ou alongação.

Foi proposto por Roelonsen e Houwink (1953) a hipótese do crescimento em rede múltipla, onde as microfibrilas de celulose estão dispostas na orientação transversa e são reorientadas axialmente durante a alongação. Preston (1974) verificou que era possível uma significativa extensão, com uma pequena reorientação, se muitas camadas contribuíssem para a expansão. Assim, Preston (1982) sugeriu o termo “passive reorientation”, em substituição ao termo “multiple network” para descrever o movimento das microfibrilas de celulose durante a alongação. Apesar da terminologia, a separação das microfibrilas no eixo longitudinal é mais substancial que o deslocamento lateral.

Muitos trabalhos têm sido realizados para a identificação do controle fisiológico da expansão celular, isto é, o papel do ambiente ácido e iônico na liberação de enzimas de parede (teoria do crescimento ácido), nas propriedades fisiológicas da parede responsáveis pela manutenção da flexibilidade e resistência mecânica (Kutschera e Schopfer, 1985; Taiz, 1984; Cleland, 1981). Apesar das divergências sobre a teoria do crescimento ácido, havia um consenso entre os fisiologistas que as glicohidrolases seriam liberadas ou ativadas em sítios específicos dentro da parede celular para clivar as ligações suporte de polissacarídeos não celulósicos, os quais interligam as microfibrilas de celulose. Esse consenso foi colocado em dúvida, visto que existem evidências da transglicosilação entre polímeros, e a extensão de parede catalisada por enzimas, *in vitro*, pode ocorrer sem eventos hidrolíticos detectáveis (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Fry *et al.*, 1992; Smith e Fry, 1991).

A xiloglucana apresenta-se, nos modelos discutidos acima, como um polímero importante no processo de expansão celular (Carpita e Gibeaut, 1993).

O desenvolvimento das técnicas GLC-MS e FAB-MS, espectroscopia de  $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$ , difração de raio X e os estudos de análise conformacional, nos dão hoje informações sobre as estruturas e os modelos tridimensionais de polímeros individuais. Estes recursos permitem estudar de maneira mais completa os componentes das paredes celulares de plantas e suas interações. Assim é possível uma melhor compreensão das funções destas estruturas em vários processos biológicos, como por exemplo a expansão celular (Guillén *et al.*, 1995).

## 2-XILOGLUCANAS

As xiloglucanas são sintetizadas no complexo de Golgi, transportadas para a parede celular onde são incorporadas a rede de celulose-xiloglucana. As cadeias laterais do heteropolímero são necessárias para dar solubilidade durante esse processo de transporte (White, *et al.*, 1993; Driouich *et al.*, 1993; Gibeaut e Carpita, 1994).

Esses polímeros encontrados, principalmente, na parede celular primária do tipo I são formados por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-glucose ligadas (1 $\rightarrow$ 4), tendo 75% das suas unidades substituídas por  $\alpha$ -D-xilose ligadas (1 $\rightarrow$ 6) à cadeia de glucose. Algumas destas unidades são substituídas por  $\beta$ -D-galactose em O-2, sendo que estas unidades podem ser substituídas em O-2 com  $\alpha$ -L-fucose. As xiloglucanas são encontradas também nas sementes de plantas dicotiledôneas, como polissacarídeo de reserva (Buckeridge *et al.*, 1992; Fry, 1989; Guidley *et al.*, 1991; Joseleau *et al.*, 1992).

Siddiqui e Wood (1977) dividiram as xiloglucanas de sementes em dois grupos. No primeiro grupo, o mais freqüente, encontram-se os amilóides, isto é, aquelas formadas por galactose, xilose e glucose; no segundo encontram-se os fucoamilóides, ou seja, xiloglucanas formadas por fucose, galactose, xilose e glucose.

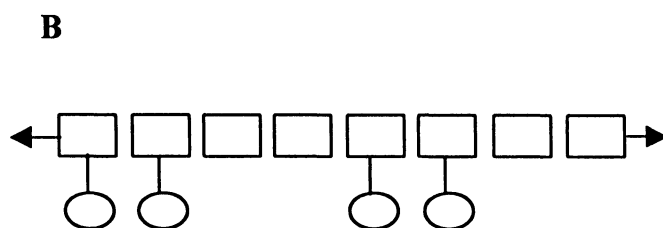
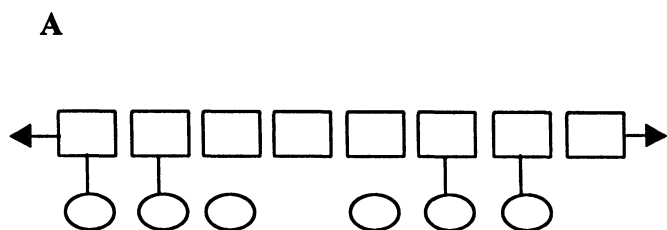
Recentemente dois grupos independentes sugeriram que as xiloglucanas de plantas Solanáceas são compostas de blocos de celotetraoses (Vincken *et al.*, 1996; York *et al.*, 1996).

Vincken *et al.* (1997) dividiram-nas em dois grupos de acordo com 2 tipos de blocos fundamentais. No primeiro grupo, chamado de poli-XXXG (Fig. 2), estão incluídas as xiloglucanas de gimnospermas e angiospermas (York *et al.*, 1990, 1993, 1995; Hisamatsu *et al.*, 1991, 1992; Renard *et al.*, 1992; Hayashi e Takeda, 1994). Este grupo é assim denominado porque 3 ou 4 unidades de glucose da cadeia principal são substituídas por xilose em O-6, resultando em subunidades XXXG. Tem-se como exemplo deste grupo as encontradas em *Tamarindus indica* (Guidley *et al.*, 1991) e *Hymenaea courbaril* (Lima *et al.*, 1993).

As xiloglucanas Poli-XXGG são aquelas de plantas Solanáceas. Apresentam 2 unidades de glucose substituídas alternadas com 2 unidades não substituídas. Exemplo: xiloglucana de células em suspensão de *Nicotiana plumbaginifolia* (tabaco), xiloglucana de tomate, batata (York *et al.*, 1996; Vincken *et al.*, 1995, 1997).

Estudos com sementes de *D. senegalense* (Wang *et al.*, 1996), planta leguminosa africana, mostraram que esta apresenta uma xiloglucana formada por Glu:Xil:Gal com uma relação molar de 1,39:1,0:0,52. A substituição por galactose é inferior aos valores encontrados para a xiloglucana de *Tamarindus indica*.

A xiloglucana isolada de folhas de *Nicotiana tabacum* tem menos que a metade de suas unidades de glucose substituídas por xilose, não tendo a estrutura típica das xiloglucanas citadas acima; sendo a unidade repetitiva XXG, e não apresenta unidades de  $\beta$ -D-Galp e  $\alpha$ -L-Fucp. Outras contendo baixo teor de xilose também foram isoladas de outras Solanáceas como a *Solanum tuberosum* (Sims *et al.*, 1996).



Unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose ligadas (1 $\rightarrow$ 4).



Unidades de  $\alpha$ -D-xilopiranosose ligadas (1 $\rightarrow$ 6) a cadeia de  $\beta$ -D-glucopiranosose.

FIGURA 2- ESTRUTURAS FUNDAMENTAIS DAS XILOGLUCANAS (Vincken *et al.*, 1997).(A) Poli-XXXG e (B) Poli-XXGG.

Uma xiloglucana isolada de cultura celular de *Nicotiana plumbaginifolia* apresentou baixo teor de substituição, isto é, apenas 40% das unidades de  $\beta$ -D-Gluc são substituídas em O-6 por  $\alpha$ -Xilp,  $\alpha$ -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Xilp,  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Xilp e  $\alpha$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Xilp. Ainda apresenta grupamentos acetílicos ligados principalmente em O-6 das unidades de Gluc que não estão substituídas por Xilp e menos comumente em C-5 das unidades de Araf. Cerca de 30% da cadeia principal de (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Gluc é O-acetilada, isto equivale a 44% de tais unidades de Gluc não substituídas por Xilp, e 15% dos terminais Araf são acetilados (Sims *et al.*, 1996).

A xiloglucana obtida da parede celular de batata apresenta também uma alta percentagem de unidades de glucose não substituídas, comparadas com as de maçã que apresenta a estrutura básica XXGG. A xiloglucana de maçã apresenta sua cadeia principal de unidades de glucose com ~75% das unidades substituídas em O-6 (Renard *et al.*, 1992). Estes polímeros têm igual quantidade de grupos de  $\alpha$ -Xilp-(1 $\rightarrow$ 2),  $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Xilp-(1 $\rightarrow$ 6) e  $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Xilp-(1 $\rightarrow$ 6) como cadeias laterais (Vincken *et al.*, 1996).

A estrutura da xiloglucana isolada de sementes de *Copaiifera langsdorfii* (Buckeridge *et al.*, 1992), (Glu:Xil:Gal: 4,0:2,8-2,9:1,5-1,7) é semelhante àquela obtida para xiloglucana de *T. indica* (Glu:Xil:Gal: 4,0:3,0-3,1:1,4). A obtida de cultura de tecidos verdes de *Populus alba* L. é semelhante a de *Acer pseudoplatanus*, apresentando unidades de fucose (Karacsonyi e Kovacik, 1989).

A xiloglucana de parede celular de gobo (*Arctium lappa* L) é semelhante àquelas obtidas a partir de dicotiledôneas (Kato e Watanabe, 1993), e a extraída do mutante *Arabidopsis thaliana* (mur1) é deficiente de  $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2) tendo em seu lugar  $\alpha$ -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2) (Zablackis *et al.*, 1996).

Em termos estruturais a xiloglucana obtida de sementes de *Hymenaea courbaril* variedade *stilbocarpa*, com rendimento de 40 a 45% em relação ao pó das sementes moídas, apresentou estrutura semelhante àquela apresenta para xiloglucana de semente *Tamarindus indica*. A xiloglucana de *H. courbaril* foi obtida por extração aquosa a temperatura ambiente com relação Glu:Xil:Gal:Ara de 26:19:6,5:1, respectivamente (Lima *et al.*, 1993). Recentemente Souza-Lima (1997) isolou uma xiloglucana purificada de sementes de *H. courbaril* com relação de Glu:Xil:Gal de 3,6:2,6:1.

Fry *et al.* (1993) sugeriram uma nomenclatura para os oligossacarídeos de xiloglucana (Fig. 3, pgs. 11 e 12), estabelecida através das unidades dos oligossacarídeos que não estão substituídas, localizadas da esquerda para a direita, sendo estas unidades designadas pelas letras: G (Glucose), X (Xilose), L (Galactose), F (Fucose) e S (Arabinose). A unidade redutora de cada oligossacarídeo pode estar sob a forma reduzida sendo acrescentada a terminação **ol**. Esta nomenclatura, apresentada em seguida, suprime as ambigüidades durante as referências aos diferentes oligossacarídeos.

### 3-INTERAÇÕES FÍSICAS DA XILOGLUCANA NA PAREDE CELULAR

As xiloglucanas são associadas com as microfibrilas de celulose, *in vitro* e *in vivo*, porém pouco se sabe sobre as bases moleculares deste comportamento. A análise conformacional das interações xiloglucana-celulose mostraram que a associação extremidade-extremidade entre a cadeia de xiloglucana e a superfície da microfibrila é impedida pelas cadeias laterais da xiloglucana (Carpita e Gibeaut, 1993; Levy *et al.*, 1997).

Os estudos demonstram que a ligação se dá via xilose, o que favorece as ligações cruzadas entre as diferentes microfibrilas. Estas ligações parecem ser de grande importância para as propriedades funcionais da matriz celular. As ligações são moduladas

ESTRUTURA	NOMENCLATURA	
	ANTIGA	ATUAL
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Xil} \quad \text{Xil} \end{array}$	-	XXG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Xil} \quad \text{Xil} \quad \text{Xil} \end{array}$	XG7	XXXG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Xil} \quad \text{Xil} \quad \text{Xil} \\ \quad \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Gal} \end{array}$	XG8	XXLG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Xil} \quad \text{Xil} \quad \text{Xil} \\ \quad \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Gal} \quad \text{Gal} \end{array}$	XG9n	XLLG
$\begin{array}{c} \text{Xil}^* \\ \uparrow \uparrow \\ \text{Gal} \\ \uparrow \uparrow \\ \text{Fuc} \end{array}$	XG3	-
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \\ \text{Xil} \\ \uparrow \uparrow \\ \text{Gal} \\ \uparrow \uparrow \\ \text{Fuc} \end{array}$	XG5	FG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Xil} \quad \text{Xil} \quad \text{Xil} \\ \quad \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Gal} \\ \quad \quad \quad \uparrow \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{Fuc} \end{array}$	XG9	XXFG

FIGURA 3 – ESTRUTURAS SIMPLIFICADAS E NOMENCLATURA PARA OLIGOSSACARÍDEOS DERIVADOS DE XILOGLUCANAS SEGUNDO FRY *et al.*, 1993. As flechas nas estruturas indicam: →, ligação β-(1→4); ↑, ligação α-(1→6); ↑↑, ligação (1→2). e o \* indica o terminal redutor que pode estar sob a forma reduzida, sendo então acrescentado à nomenclatura a terminação ol.

(Continuação da Figura 3)

ESTRUTURA	NOMENCLATURA	
	ANTIGA	ATUAL
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \text{Xil} \qquad \qquad \text{Xil} \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \text{Gal} \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \text{Fuc} \end{array}$	XG8bis	GXFG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \text{Xil} \qquad \text{Xil} \qquad \text{Xil} \\ \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \text{Gal} \qquad \text{Gal} \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \text{Fuc} \end{array}$	-	XLFG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \text{Xil} \qquad \text{Xil} \qquad \text{Xil} \\ \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \text{Gal} \qquad \text{Gal} \\ \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \text{Fuc} \qquad \text{Fuc} \end{array}$	XG11	XFFG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \text{Xil} \qquad \text{Xil} \\ \uparrow \\ \text{Gal} \\ \uparrow \\ \text{Ara} \end{array}$	-	SXG
$\begin{array}{c} \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu} \rightarrow \text{Glu}^* \\ \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \text{Xil} \qquad \text{Xil} \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \text{Gal} \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \text{Ara} \end{array}$	-	GXSG

---

pelas unidades de galactose e fucose da cadeia lateral da xiloglucana (Finkenstadt *et al.*, 1995).

Foi analisada, *in vitro*, a influência das cadeias laterais das xiloglucanas de parede celular de ervilha e de semente de nasturtium, na interação xiloglucana-celulose. Os resultados obtidos confirmaram os dados apresentados nas simulações de dinâmica conformacional. A xiloglucana de ervilha, que apresenta sua cadeia lateral formada por um trissacarídeo (XilGalFuc) tem 2 vezes mais ligações com a celulose que a xiloglucana de nasturtium, a qual apresenta uma cadeia lateral formada por XilGal. Estes resultados são consistentes com as diferenças de papéis desempenhados pelas duas xiloglucanas durante o processo de crescimento celular (Levy *et al.*, 1997).

As paredes celulares isoladas do endosperma de alface podem sofrer autohidrólise. Estas foram embebidas em água a 25 e 32°C para a germinação, verificando-se que a autohidrólise pode ser dependente da temperatura, sendo as condições ótimas 25°C e pH 5. Tem-se terminação da autohidrólise a 32°C, que pode ser diminuída pela inclusão de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) ou quinetina no meio. A autohidrólise da parede celular é mediada por enzima e aumenta durante a germinação (Dutta *et al.*, 1994).

Talbott e Pickard (1994) estabeleceram um método para a separação das hemiceluloses da parede celular, por gel filtração em HPLC, utilizando como modelo a parede celular de epicótilo de ervilha. Os autores monitoraram as variações de composição monossacarídica e de massa molecular dos componentes hemicelulósicos durante estudo gravitrópico. O trabalho revelou que o maior sinal dos polímeros hemicelulósicos, durante o curso gravitrópico, foi o aumento transitório de um polímero de 500 KDa em preparações epidermais. Por análise da composição monossacarídica, verificou-se que este polímero poderia ser uma xiloglucana. A resposta gravitrópica foi significativa após 20 min da colocação horizontal, quando a curvatura gravitrópica foi evidenciada. Ocorreu um

declínio em 40 min, que retornou aos níveis iniciais aos 60 min. O sinal superior foi interpretado como a associação da xiloglucana de baixa massa molecular em grandes complexos, os quais podem reforçar a estrutura de parede, levando à diminuição da extensibilidade necessária para conter o aumento da força direcionadora para alongação. Existe um aumento da cadeia de xiloglucana, o qual envolve a modificação dos polímeros da parede celular já existente, durante a fase gravitrópica, o que pode ser explicado por dois mecanismos: pela existência de uma transglicosilase, ou em função da alteração do grau de associações covalentes que comprometem a habilidade do polímero de formar associações não covalentes.

No sistema acima, o aparecimento da xiloglucana de baixa massa molecular se dá após algum tempo, o que pode ser devido à ativação ou síntese das hidrolases de parede. Como resposta gravitrópica há um aumento da xiloglucana de alta massa molecular, aumento das ligações cruzadas e aumento da extensibilidade (Talbot e Pickard, 1994).

Ao ser analisada a interação da xiloglucana com celulose, os parâmetros considerados foram o tamanho da cadeia de xiloglucana, pH e a origem da celulose. Esta interação ocorre com no mínimo 5 unidades. Não é sabido se estas 5 unidades estão contíguas. Há “loops” onde a xiloglucana não está ligada e “trains” onde há interação que ocorre através de 6 unidades consecutivas ou grupos de 2 ou 3 unidades (Vincken *et al.*, 1995).

A seqüência de 3 ou 4 blocos que compõe a estrutura básica de xiloglucana é a dimensão crítica para interação com celulose. Apesar da xiloglucana se ligar a celulose através de blocos individuais, isso não significa que a ligação seja reversível. A quantidade de adsorção aumenta com o aumento da concentração de xiloglucana. A adsorção dos oligossacarídeos de xiloglucana à celulose se dá através de um efeito cooperativo (Vincken

*et al.*, 1995).

Quando a quantidade de xiloglucana ultrapassa a capacidade de ligação da celulose, há adsorção preferencial de moléculas grandes. Isto ocorre porque elas ligam mais favoravelmente, em termos de entropia, comparadas com pequenas moléculas. A celulose é uma matriz porosa, sendo que a maior parte da sua superfície formada por pequenos poros. Os grupos oligossacarídicos são grandes para alcançar os menores poros (Vincken *et al.*, 1995).

Além das interações celulose-xiloglucana, Coimbra *et al.* (1995) apresentaram dados que sugerem a existência de ligações covalentes entre xilana acídica e xiloglucana na parede celular de polpa de oliva. Verificaram que mesmo após uma seqüência de purificação obtiveram, por análise de metilação, resultados que demonstraram a existência de uma xilana e uma xiloglucana. Utilizaram uma endoxilanase pura, a qual agiu especificamente sobre a xilana, porém a massa molecular média da xiloglucana e xilana foram reduzidas.

As ligações entre xiloglucana-celulose limitam a expansão da parede celular. Assim, tem sido sugerido que a quebra por enzimas endolíticas das ligações das moléculas de xiloglucana, que interagem com a celulose (ligação cruzada), é necessária para o alargamento da célula durante o crescimento. Além disso, alguns dos oligossacarídeos liberados por enzimas endolíticas exibem atividades biológicas e são capazes de inibir ou promover o crescimento celular (Finkenstadt *et al.*, 1995; Darvill *et al.*, 1992).

O processo de degradação da xiloglucana da parede celular epidermal de epicótilos do feijão Azuki tem um papel essencial para a alongação induzida. Isto se dá em 2 etapas: primeiro tem-se a clivagem parcial da cadeia principal de glucana da xiloglucana em produtos de 50 KDa, sem nenhuma degradação das cadeias laterais. A seguir ocorre a

degradação total da molécula, a qual é iniciada pela remoção da unidade de fucose da cadeia lateral. A auxina parece estimular a degradação da xiloglucana pela indução da síntese *de novo* das enzimas da parede celular envolvidas na degradação ou pela ativação destas enzimas já existentes na parede celular (Hoson, 1993).

A parede celular apresenta algumas enzimas como as endoglucanases e a xiloglucana endotransglicosilase (XET) que podem modificar a rede de celulose-xiloglucana. As endoglucanases podem clivar as ligações cruzadas da xiloglucana de forma irreversível. As XETS podem cortar a cadeia de xiloglucana (substrato doador) e então reconectar o fragmento resultante em outra cadeia de xiloglucana. Supõe-se que estas enzimas têm um grande impacto na arquitetura da parede celular durante o crescimento e diferenciação celular (Potter e Fry, 1993, 1994; Nishitani e Tomonaga, 1992).

Na primeira etapa de degradação da xiloglucana, da parede celular epidermal de epicótilos de feijão Azuki, podem estar envolvidas as endo-1,4- $\beta$ -glucanases ou XETS, porém não deve haver a ação das endoglucanases semelhantes as existentes em ervilha, que resultam na produção de monossacarídeos e heptassacarídeos (Hoson *et al.*, 1995).

A XET catalisa a transferência de um segmento de cadeia de uma xiloglucana para outra, causando um alargamento do pico em filtração em gel. Porém, sem variação na massa molecular média. Sendo assim, ela não estaria envolvida na primeira etapa de degradação. Como na primeira fase não se tem a produção de oligossacarídeos ou monossacarídeos, as enzimas que catalisam esta etapas podem ser endoglucanases, porém ainda não foram isoladas. A segunda etapa é ativada pela  $\alpha$ -L-fucosidase (Hoson *et al.*, 1995).

Na família Poacea, a degradação de (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanas, e não de xiloglucanas, está associada à perda da parede celular (Hoson, 1993). Em coleóptilo de

milho esta mesma degradação se dá em duas etapas, via intermediário de 10 KDa. Uma endoglucanase parece estar envolvida na primeira etapa. Tanto a degradação de xiloglucanas em dicotiledôneas, como em Poacea podem ser realizadas em duas etapas (Huber e Nevins, 1981; Hoson *et al.*, 1995).

Em paredes celulares de plantas superiores existem diferentes tipos de endoglucanases que são diretamente capazes de hidrolisar xiloglucanas ou (1→3), (1→4)-β-D-glucanas. Isto sugere que a degradação da matriz polissacarídica da parede celular primária é regulada pelo balanço entre a reação em duas etapas e a hidrólise direta (Hoson *et al.*, 1995).

#### 4-MOLÉCULAS SINALIZADORAS EM PLANTAS

Oligossacarídeos envolvidos como sinalizadores em resposta de defesa foram identificados em plantas, nos anos 1970, por Albersheim e colaboradores. O termo elicitador, originalmente, foi utilizado para se referir a moléculas e outros estímulos que induzem a síntese de fitoalexinas. Destroem patógenos ou restringem seu desenvolvimento intracelular, em células de plantas (Keen, 1975). Hoje, utiliza-se este termo para moléculas que estimulam algum mecanismo de defesa em plantas (Dixon, 1986, Cheong *et al.*, 1991; Ryan, 1994). Diferentes constituintes da parede celular, originados da planta hospedeira ou do microorganismo invasor, podem induzir a acumulação de fitoalexinas ou respostas de defesa em plantas. Por exemplo: carboidratos complexos de fungo e de parede celular de plantas, enzimas microbianas, elicitores abióticos (metais pesados) e luz UV (Hahn *et al.*, 1989; Darvill e Albersheim, 1984).

Entre os mecanismos de defesa em plantas, a biossíntese e o acúmulo de fitoalexinas têm sido os mais estudados. São fatores bioquímicos de resistência pós-

---

formados, isto é, fatores que estão ausentes ou em níveis baixos nas plantas antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos (Pascholati e Leite, 1994, 1995).

Liénart *et al.* (1990) estudaram o efeito de um indutor abiótico em cultura de células de *Rubus fruticosus*, observando as atividades laminarinase, xilanase e quitinase. A ativação de hidrolases é uma forma de defesa bioquímica da planta. Os oligossacarídeos e polissacarídeos podem ser uma parte do sistema sinalizador, o qual promove a transcrição e tradução de proteínas de estresse.

A adaptação da planta ao seu ambiente parece resultar de uma série de mecanismos bioquímicos complexos iniciados pelo reconhecimento de um oligossacarídeo ou polissacarídeo pela célula. O indutor pode, no início dos eventos bioquímicos, transmitir uma informação até estimular enzimas e genes. Assim a estimulação se traduz por uma resposta fisiológica. Portanto, a elicitação consta de uma fase de reconhecimento do elicitor pelas células, seguido da transmissão de um sinal e a indução de uma resposta fisiológica (Pascholati e Leite, 1994, 1995).

Aspectos estruturais específicos, de componentes de carboidratos complexos de glicoproteínas, têm sido estudados como sinais de reconhecimento para vários processos químicos e fisiológicos em animais e leveduras, tais como: turnover de glicoproteínas, adesão célula-célula, citólise e ação hormonal (Ryan, 1994).

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é uma das plantas monocotiledôneas investigadas que demonstrou sintetizar fitoalexinas. Sorgo jovem sintetiza duas fitoalexinas, a apigenimidina e luteolinidina, e uma classe rara a deoxiatocianidina, como resposta ao ataque da infecção do fungo *Colletotrichum graminicola*, o qual causa a antracnose. As fitoalexinas em sorgo parecem ser sintetizadas em inclusões subcelulares no

interior do hospedeiro, as células epidermais que são penetradas pelo fungo. Esta síntese localizada sugere que a resposta via síntese de fitoalexinas ocorre inicialmente nas primeiras células que vem sobre o ataque do fungo, e não simplesmente uma resposta de células que circundam o local da infecção original (Snyder e Nicholson, 1990).

Os fenilpropanóides e os flavonóides são sintetizados no interior do citoplasma. A síntese das fitoalexinas em inclusões é sustentada pelas observações que as inclusões citoplasmáticas acumulam-se primeiro como corpos esféricos claros, e então, tornam-se altamente pigmentados quando eles estão próximos ao local do ingresso do fungo. Somente mais tarde o processo de infecção atinge as células vizinhas, isto sugere que esses corpos são lugares de síntese ou acumulação das fitoalexinas de sorgo (Snyder e Nicholson, 1991).

As fitoalexinas são ausentes ou em baixos níveis em plantas saudáveis. As enzimas que catalisam a síntese de fitoalexinas, sofrem síntese *de novo*, quando a planta é exposta ao microorganismo ou a um outro estímulo efetivo (Darvill e Albersheim, 1984).

As fitoalexinas, uma vez acumuladas, são catabolisadas ou detoxificadas por muitos microrganismos, bem como pela planta (Pascholati e Leite, 1994, 1995).

Darvill e Albersheim (1984) sugeriram que todos os elicitores abióticos e alguns dos bióticos estimulam acúmulo de fitoalexinas por causa de liberação de um elicitor endógeno da parede celular de plantas. Elicitores abióticos funcionam pela ativação de elicitores bióticos presentes em uma forma inativa em plantas não infectadas.

A habilidade de plantas superiores de acumular fitoalexinas é comum, em monocotiledôneas bem como em dicotiledôneas. Inúmeros estudos mostram que as fitoalexinas não somente acumulam-se nos lugares de infecção, seguido da penetração pelo micróbio, como altas concentrações, embora fracamente, inibem o crescimento de fungo e/ou bactéria (Pascholati e Leite, 1994, 1995; Darvill e Albersheim, 1984).

Evidências sugerem que patógenos podem ser capazes de secretar moléculas que inibem especialmente a síntese de fitoalexinas em seus hospedeiros (Darvill e Albersheim, 1984; Pascholati e Leite, 1994, 1995).

O primeiro elicitor biótico estudado foi o monobicolina A (pequeno peptídeo), obtido de micélio de *Monilinia fructicola*, um fungo que ataca árvores frutíferas. A monobicolina A elicita o acúmulo de fitoalexinas em vagens de feijão, porém não demonstrou ter um papel fisiológico na resistência a doenças, pois não elicita fitoalexinas em um hospedeiro de *M. fructicola* (Darvill e Albersheim, 1984).

O sistema patógeno-hospedeiro melhor caracterizado, no qual oligossacarídeos da parede celular de fungo ( $\beta$ -glucosídeos) demonstraram elicitar fitoalexinas, é o de *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, patógeno fúngico que causa podridão em raízes e caules na planta hospedeira, a soja (Ayers *et al.*, 1976a,b,c; Sharp *et al.*, 1984).

Oligossacarídeos de  $\beta$ -glucose sintetizados quimicamente, grau de polimerização (GP) de 6 a 10, foram testados para verificar qual a estrutura necessária para a indução da acumulação de fitoalexinas em cotilédones de soja. A estrutura eficaz trata-se de um heptassacarídeo de  $\beta$ -glucose em concentrações 10 nM, podendo este estar reduzido ou ter seu terminal redutor conjugado com iodo tiramina (Darvill e Albersheim, 1984; Cheong *et al.*, 1991).

Outros oligossacarídeos de  $\beta$ -glucose isolados *Phytophthora megasperma* não mostraram atividade elicitora em concentrações abaixo de 400 mM. Esses resultados foram uma primeira evidência que aspectos estruturais específicos são necessários para um oligossacarídeo de  $\beta$ -glucose atuar como um elicitor efetivo para acumulação de fitoalexinas (Sharp *et al.*, 1984).

Os oligossacarídeos derivados de quitina [*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminas ligadas (1 $\rightarrow$ 4)] e quitosana [ $\beta$ -D-glucosaminas ligadas (1 $\rightarrow$ 4)], que são componentes estruturais das paredes celulares de muitos fungos e exoesqueletos de invertebrados, apresentam atividades elicitoras induzindo a acumulação de fitoalexinas em ervilha, cultura de células de soja, cultura de células de salsa. Esses oligossacarídeos também induzem a acumulação de inibidores de proteinase em folhas de tomate e batata, a acumulação de calose (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucana em suspensão de células de salsa e de protoplastos de *Catharanthus roseus* e induzem ainda a lignificação de paredes das células em cultura de *Pinus elliotti* (Darvill *et al.*, 1992).

As fitoalexinas em soja foram induzidas também por galacturonídeos (hexagalacturonídeo monoinsaturado) obtidos de parede celular de folhas de *Humulus lupulus*. Estabeleceu-se que há síntese *de novo* da fitoalexina em soja (Cheong *et al.*, 1991; Glocker *et al.*, 1993).

A homogalacturonana é um polissacarídeo péctico, composto somente de unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico ligadas (1 $\rightarrow$ 4), importante componente de parede celular primário de plantas superiores. Os oligossacarídeos derivados desse polissacarídeo apresentam uma variedade de funções como: indução de fitoalexinas, deposição de lignina, produção de isoperoxidasas e água oxigenada (Darvill *et al.*, 1992).

Estudos em cultura de células de *Catharanthus roseus* mostraram que o tratamento com baixas concentrações de um extrato de fungo (*Pythium vexans*) estimula a produção dos alcalóides, ajmalicina e catarantina que são liberados no meio, enquanto que a serpentina não é liberada. A reelicitação não resulta em uma constante reestimulação dos alcalóides, se as células forem pré-tratadas com o elicitor (Nef-Campa *et al.*, 1994).

*Citrus limon* foi tratado com endopoligalacturonase de *Alternaria alternata* obtendo-se oligossacarídeos de diferentes GP. Os oligossacarídeos obtidos foram

fragmentos de pectina da parede celular ou do ácido poligalacturônico, contendo de 17 a 23, ou 13 a 20 unidades do ácido galacturônico. Em plantas intactas, a máxima ativação da fenilalanina amônia liase (FAL) foi obtida após 20 h de tratamento com a endopoligalacturonase e, em plantas feridas, depois de 7 ou 4 h de tratamento com endopoligalacturonase ou oligossacarídeos, respectivamente. Após 42 h da ativação da FAL houve o aparecimento de fitoalexinas. A imunoprecipitação com anticorpos FAL confirmou que o efeito observado foi devido ao aumento da quantidade de enzima. O mecanismo da ativação da FAL em plântulas de limão parece envolver a síntese *de novo* da enzima, e é inteiramente relacionado com a síntese de um componente pós-infeccional de defesa, que foi também observado em plântulas intactas de *C. limon*, como resposta para infecção por fungo. A resposta celular da planta deve envolver sistemas de reconhecimento específico para oligossacarídeos liberados da parede celular da planta pela endopoligalacturonase de fungo (Roco *et al.*, 1993).

O estabelecimento da simbiose de um fixador de nitrogênio, do gênero *Rhizobium*, e seus legumes hospedeiros envolvem um complexo processo de infecção. Este processo requer uma troca de moléculas sinais entre a bactéria e as células do eucarionte hospedeiro, que resulta na regulação coordenada da expressão do gene em ambos, *Rhizobium* e legume. O fator de nodulação de *Rhizobium* causa, no legume hospedeiro, deformação nos pêlos da raiz, formação de raízes curtas-compactas e divisão celular cortical, sendo esta última a resposta hospedeiro específica mais representativa dos fatores de nodulação (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1992).

Oligossacarídeos ativos para regulação de defesa ambiental, ou resposta de desenvolvimento, têm recebido o nome de oligossacarinas. Velupillai e Harn (1994) descrevem o primeiro exemplo de oligossacarina animal, o lacto-*N*-fucopentaose III

(LNFP-III), derivado da superfície de antígeno de ovos do parasita *Schistosoma mansoni*, o qual tem um papel como sinalizador na interação do parasita com o animal hospedeiro, dessa forma regulando a resposta imune do hospedeiro, sendo o primeiro carboidrato complexo que regula a elaboração de uma citocina (Ryan, 1994).

#### 5-OLIGOSSACARÍDEOS DERIVADOS DE XILOGLUCANAS

Os oligossacarídeos resultantes da hidrólise das xiloglucanas têm sido considerados oligossacarinas por alguns pesquisadores, pois regulam o crescimento celular induzido por auxina, a morfogênese e indução de inibidores de proteinases (Darvill *et al.*, 1992). Os oligossacarídeos de xiloglucana são obtidos por hidrólise enzimática com celulasas de diferentes fontes como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma sp*, *Trichoderma viride* (York *et al.*, 1993; Hisamatsu *et al.*, 1991, 1992; Guillén *et al.*, 1995).

Aqueles obtidos de cultura de parede celular de sementes de *Tamarindus indica* foram isolados e suas estruturas foram determinadas. Os obtidos de xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorfii* (Buckeridge *et al.*, 1994) e de ciclame (Braccini *et al.*, 1995) apresentaram estrutura semelhante àqueles de xiloglucana semente de *T.indica* (York *et al.*, 1993).

Guillén *et al.* (1995) estudaram os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana de caules e raízes de ervilhas, obtendo estruturas deficientes em xilose (GXFG, GXXG). Os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana de batata apresentaram as seguintes estruturas: XXG, XLG, LXG, SXG, GXLG, GXSG. Sendo “S” substituição por arabinose (Vincken *et al.*, 1996).

Hantus *et al.* (1997) isolaram oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise enzimática de xiloglucana de jojoba que apresenta unidades L e D-galactosil em suas cadeias laterais. Nos oligossacarídeos XXJG e XLJG, a letra J representa a substituição por

L-galactose na posição 2 da unidade de  $\beta$ -D-Galp, sendo as cadeias laterais  $\alpha$ -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Xilp-(1 $\rightarrow$ 6), estrutura até então inédita, esta cadeia lateral é estruturalmente homóloga a cadeia lateral contendo fucose já citadas anteriormente.

Os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana de parede celular de bulbo de cebola, alho e seus híbridos demonstram a predominância dos oligossacarídeos: XLFG, XXFG, XXLG e XXXG (Ohsumi e Hayashi, 1994). O mesmo ocorrendo para os oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucana de cultura de células de *populus alba* L. (álamo) (Hayashi e Takeda, 1994).

Buckeridge *et al.* (1997) isolaram o oligossacarídeo XXXXG a partir da xiloglucana de cotilédones de *H. courbaril*, após tratamento inicial com endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase de *Trichoderma viride*, seguido da hidrólise sucessiva com  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -xilosidase e  $\beta$ -glucosidase de nasturtium. Verificando que este oligossacarídeo é a seqüência repetitiva neste polímero.

Os oligossacarídeos XXXG e XXFG isolados de cultura de células de rosa foram testados para verificar seu efeito na alongação de hastes em ervilhas, em duas concentrações, 100 e 1000 nM, sendo a segunda mais efetiva. O efeito promotor de crescimento destes oligossacarídeos é baseado nas suas habilidades de aumentar a capacidade da parede de suportar a extensão induzida pelo meio ácido (tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 4,5), e não no efeito direto sobre a viscoelasticidade de parede (Cutillas-Iturralde e Lorences, 1997).

Os oligossacarídeos afetam a ação dos fitohormônios, que ocorrem naturalmente, e controlam vários processos fisiológicos nas células de plantas. O controle da concentração relativa de um dado fitohormônio no ambiente celular, em um determinado estágio de desenvolvimento, é uma das condições que determina a atividade biológica. A atividade pode ainda ser afetada pela síntese *de novo*, degradação ou através

da sinergia com outros metabólitos. Estes eventos ainda podem ser influenciados pelos fatores ambientais, tais como: luz, fotoperíodo, temperatura, infecção, fermentos e condições anaeróbicas (Kleczkowski e Schell, 1995).

O ácido 3-indol-acético (IAA) está envolvido na regulação de diversos processos, tais como: alongação, divisão e diferenciação celular. Os conjugados desse ácido são predominantemente de estrutura éster (glucose e *mio*-inositol) e amida (aminoácido) (Bandurski *et al.*, 1977; Delbarre *et al.*, 1996).

Os ésteres conjugados são predominantes em plantas monocotiledôneas. No endosperma de castanha, mais de 12 ésteres de IAA foram identificados. IAA pode estar conjugado a componentes de alta massa molecular como IAA-glucana (7,5 unidades de glucose por IAA) e IAA-glicoproteína encontrado em sementes de cereais (Kleczkowski e Schell, 1995; Zazimalová *et al.*, 1995).

A quantidade e a qualidade do IAA conjugado existente são regulados pelo tecido específico e pelos processos de desenvolvimento. Os ácidos indol-acético conjugados, além de suas funções como uma fonte de auxina endógena, também podem ter função de proteção contra a degradação oxidativa e transporte de IAA. Os IAA conjugados podem ser especialmente importantes em semente de grãos, onde eles transportam IAA do endosperma da semente através do xilema para as extremidades dos coleótilos e folhas jovens (Kleczkowski e Schell, 1995).

Moon *et al.* (1994) estudaram a interação entre o fator de crescimento epidermal (EGF), encontrado na saliva de muitos herbívoros, e o IAA em secções de coleótilos de *Avena sativa*, *Sorghum bicolor* e *Zea mays*. Verificaram que esta interação pode permitir que a planta reconheça e responda ao mensageiro bioquímico animal, resultando na mudança e na alongação de célula da planta que, finalmente, pode alterar as vias de crescimento da planta.

A citocinina é um fitohormônio que controla uma variedade de processos de crescimento e desenvolvimento, incluindo a divisão celular, senescência, mobilização de nutrientes, maturação de cloroplastos e morfogênese. A zeatina é a mais abundante citocinina encontrada livre. Normalmente a citocinina conjugada (citocinina ribosídeo e glucosídeo) é menos ativa (Sembdner *et al.*, 1994; Kleczkowski e Schell, 1995).

As giberelinas (GA) estão envolvidas, entre outros processos, na alongação do caule, indução de caracter masculino das flores, amadurecimento das frutas e germinação da semente. GAs são terpenóides, estando normalmente conjugadas com glucopirranose. O efeito de GA sobre a alongação de hastes de ervilhas intactas demonstrou que a giberelina estimula o crescimento pelo aumento no comprimento e número de células (Yang, *et al.*, 1996).

Pearce e Ryan (1991) isolaram e caracterizaram o primeiro hormônio peptídeo em planta, que é semelhante a um hormônio peptídeo animal.

Também foi identificado em plantas um análogo de prostaglandina, o ácido jasmônico, como um sinal intracelular comum que regula a síntese de uma variedade de compostos como respostas ambientais e de desenvolvimento (Ryan, 1994). Se alguns ou todos estes sinais análogos entre animais e plantas são de origem convergentes ou divergente é ainda desconhecido. O conhecimento fundamental indica que estas vias sinalizadoras serão importantes no entendimento de como várias plantas e animais competem e sobrevivem em ambientes hostis, e talvez promoverá meios adicionais para a solução de vários problemas médicos urgentes. Como exemplo pode-se citar os estudos com (1→3)- $\beta$ -D-glucanas como imunomoduladores, tendo atividade antitumoral, antibacteriana, antiviral e anticoagulante (Bohn e BeMiller, 1995).

Os oligossacarídeos obtidos de xiloglucana têm demonstrado atividade como inibidores de crescimento, isto é, função antiauxínica, a qual tem sido bastante

estudada. Esta atividade foi evidenciada, *in vivo* e *in vitro*, em concentrações de 1 a 100 nM, com os oligossacarídeos fucosilados XXFG, XFFG, GXFG, XLFG, FG e fucosil lactose, de diferentes fontes. O oligossacarídeo XXFGol (conc.  $10^{-8}$  M) demonstrou inibir a indução da elongação mediada por 2,4-D em segmentos de caule de ervilha (York *et al.*, 1984; Augur *et al.*, 1992; McDougall e Fry, 1989).

A atividade biológica dos oligossacarídeos derivados de xiloglucanas pode estar relacionada com o número e tipo de unidades monossacarídicas que compõem o oligossacarídeo. Estudos têm demonstrado que no tratamento de xiloglucanas com celulasas são obtidos oligossacarídeos como o denominado XXFG (nonassacarídeo fucosilado), que apresenta atividade antiauxina, isto é, inibe o crescimento celular. Esta inibição é atribuída à presença da unidade  $\alpha$ -L-fucopiranosose ( $10^{-9}$  M) na cadeia lateral da xiloglucana ligada em O-2 de unidade de  $\alpha$ -D-xilopiranosose. Já o oligossacarídeo XLLG (nonassacarídeo não fucosilado) comporta-se aparentemente como um ativador do crescimento celular (McDougall e Fry, 1990).

A atividade xiloglucana endotransglicosilase (XET) foi identificada em células extraídas de diferentes plantas, por exemplo em ervilha e tomate (Potter e Fry, 1993, 1994; Farkas *et al.*, 1992; Smith e Fry, 1991). Esta enzima é capaz de catalisar a reação de transferência de uma porção de cadeia de xiloglucana para um oligossacarídeo de xiloglucana. Estudo iniciais indicaram o XXFG como o oligossacarídeo acceptor. Esta enzima tem alta especificidade por xiloglucana como um glicosil doador, o  $K_m$  para XXFG foi de 50  $\mu$ M, pH 5,5 (Fry *et al.*, 1992).

Potter et Fry (1993) verificaram uma correlação entre  $GA_3$  e o aumento do comprimento dos segmentos de ervilha. A atividade específica da XET é aumentada de 3 a 6 vezes durante a elongação. A atividade XET aumenta também quando a elongação é induzido por 2,4-D em suspensão de células de cenoura (Hetherington e Fry, 1993).

Foram isoladas proteínas que induzem crescimento em hipocótilos de pepinos, que tem alta atividade XET, mas não induzem a extensão da parede. A fração protéica da parede altamente purificada do mesmo tecido induz à expansão da parede, porém a atividade XET é mínima, não sendo suficiente nem necessária para a extensão das paredes isoladas de hipocótilos de pepino (McQueen-Mason *et al.*, 1993).

Os testes realizados em folhas de feijão e caules de ervilha demonstraram que a capacidade de alguns oligossacarídeos de promover a despolimerização enzimática de xiloglucanas, bem como competir pela transferência de xiloglucana para XXXGol é catalisada pela XET. Para as duas atividades a estrutura mínima necessária é XXG, isto é, duas unidades de xilose não substituídas são necessárias (Lorences e Fry, 1993).

A correlação entre ação de GA<sub>3</sub> e atividade XET foi testada em hipocótilo de alface e pepino, e em células em suspensão de espinafre. No hipocótilo de alface existe um aumento de atividade XET com a aplicação de GA<sub>3</sub>, porém a atividade XET não é aumentada com o uso da IAA. Entretanto, em hipocótilos de pepino tanto GA<sub>3</sub> como IAA ampliam a atividade XET. O mecanismo do efeito de GA<sub>3</sub>, sobre o acúmulo de XET, parece não ser simplesmente promovido pelo hormônio (Potter e Fry, 1994).

Em cultura de células de espinafre o GA<sub>3</sub> causa a promoção bifásica da expansão celular, as custas da divisão celular e síntese de clorofila. GA<sub>3</sub> reduz a acumulação de XET no meio, principalmente, em estágios iniciais do ciclo de crescimento (Potter e Fry, 1994).

A manutenção da alongação da raiz, a baixo potencial de água ( $\psi_w$ ) em milho, é associada a um aumento da atividade XET. Este aumento está de acordo com sua função de aumentar o afrouxamento da parede para permitir continuar a alongação, na região apical a baixo  $\psi_w$ , apesar da incompleta manutenção do turgor. Foi demonstrado

que o aumento de atividade XET em baixo  $\psi_w$  requer a acumulação de ABA (ácido abscísico) (Wu *et al.*, 1994).

Rose *et al.* (1996), através de estudos com RNA de epicótilos de nasturtium, determinaram que existem 2 XETs de seqüências divergentes de aminoácidos. Suas expressões dão-se por vias mutuamente exclusivas, tendo afinidades diferentes por xiloglucana.

O cDNA isolado de tomate apresentou também dois diferentes códigos, tendo um deles 40% de homologia com aquele obtido para XET de nasturtium (Arrowsmith e de Silva, 1995). A hibridização “southern” sugere que esses clones são membros de uma pequena família de multigenes que codificam XET de tomate.

Xu *et al.* (1995) estudaram o gene TCH4 de *Arabidopsis* que foi expresso em *Escherichia coli* e apresentou atividade XET. A expressão de TCH4 é regulada por auxina, brassinoesteróides, e pelo choque mecânico, térmico e luminoso. A expressão de TCH4 foi localizada nos tecidos relacionados com expansão ou modificação da parede celular. Além de XETs já identificadas, estudos de Fanutti *et al.* (1996) demonstraram a existência de uma NXET, assim chamada por apresentar atividades de xiloglucana endotransglicosilase e hidrolase, sendo os sítios de transglicosilação e hidrólise idênticos. A hidrólise ocorre somente em baixas concentrações de substrato ou durante o primeiro estágio da degradação das moléculas de xiloglucanas de alta massa molecular. A xiloglucana endotransglicosilase foi investigada inicialmente em cotilédones de nasturtium.

O canal aniônico nas membranas de células-guarda do plasma de *Vicia faba*, GCAC1, possui sítios de reconhecimento para a auxina na porção extracelular do canal. As auxinas induzem a uma mudança de voltagem dependente do canal aniônico para os

potenciais hiperpolarizados (Lohse e Hedrich, 1995).

## 6-ATIVIDADE $\alpha$ -L-FUCOSIDASE

A atividade  $\alpha$ -L-fucosidase foi detectada em caules de ervilha em crescimento e sementes germinadas de nasturtium, utilizando-se XXFG marcado [ $^{14}$ C]fucose. O tratamento dos caules de ervilha com a auxina aumenta a atividade endo-1,4- $\beta$ -glucanase que hidrolisa xiloglucana na região de crescimento apical, não aumentando a atividade  $\alpha$ -L-fucosidase sobre XXFG. Porém na germinação das sementes de nasturtium tem um aumento da 1,4- $\beta$ -glucanase, bem como da  $\alpha$ -L-fucosidase (Farkas *et al.*, 1991).

Augur *et al.* (1995) purificaram uma  $\alpha$ -L-fucosidase entre as proteínas da parede celular de epicótilo de ervilha. Membranas microssomais de epicótilo de ervilha demonstraram a presença de atividade galactosil transferase que é capaz de transferir UDP-[ $^{14}$ C]galactose para cadeias de xiloglucanas pré-formadas. A adição de xiloglucanas de sementes estimula a incorporação de [ $^{14}$ C]galactose pelos microssomas de ervilhas .

A galactosilação foi testada em xiloglucanas de ervilhas, tamarindo e nasturtium. A incorporação da galactose em tamarindo e ervilha resulta principalmente no oligossacarídeo XXLG e para o nasturtium XLXG. A galactosil transferase de ervilha catalisa a reação a seguir (Faik *et al.*, 1997):



A galactosil transferase necessita 3 grupos de heptassacarídeos contíguos para exercer sua atividade catalítica. Isto é comprovado por não se verificar efeito sobre um ou dois grupos contíguos. O mesmo acontece para fucosil transferase. Estas duas

enzimas foram identificadas em compartimentos separados do complexo de Golgi (Zhang e Staehelin, 1992; Camirand *et al.*, 1987).

Maclachlan *et al.* (1992) estudaram a fucosilação de xiloglucana de sementes de *Tamarindus indica* e dos oligossacarídeos obtidos a partir desta xiloglucana por hidrólise parcial, utilizando fucosiltransferase isolada de cultura de tecidos de epicótilo de *Pisum sativum* L e GDP-[<sup>14</sup>C]fucose como doador. Esses autores verificaram que a fucosilação é dependente da galactosilação do receptor e que não houve diferença de incorporação de fucose entre a xiloglucana intacta e os diferentes oligossacarídeos.

### 7-DESCRIÇÃO DA *Hymenaea courbaril*

A *Hymenaea courbaril*, conhecida como jatobá, da família Caesalpinoideae, é uma planta nativa brasileira, de grande incidência na região sudeste, porém, encontrada de norte a sul do país. O gênero *Hymenaea* compreende cerca de 15 espécies, sendo que 14 delas ocorrem no Brasil. A *H. courbaril* (Fig. 4, pg. 32) é uma árvore de grande porte, de copa larga que atinge geralmente 18 m de altura por 1 m de diâmetro. As folhas são pecioladas, de colocação alternada, cujos folíolos, em número de dois, de forma oval, estão dispostos um perto do outro. As flores são pequenas em corimbos terminais paucifloros, pétalas brancas, pouco maiores do que o cálice; o fruto é uma vagem de cor marrom avermelhada, medindo 8 a 15 centímetros de comprimento por 3 a 5 centímetros de largura. Apresenta consistência dura, com forma arredondada e outras vezes achatada, contendo 3-6 sementes, envoltas numa substância farinácea, compacta, adocicada e comestível. Floresce em janeiro–fevereiro. Um quilo de sementes encerra cerca de 270 unidades (Rizzini, 1978; Carneiro, 1989; Lorenzi, 1992). A madeira produzida pelo vegetal é muito pesada e dura; difícil de trabalhar; imputrescível fora do contato com o solo úmido. Apresenta coloração que vai do róseo-pardacento ao pardo-avermelhado escuro, uniforme ou com veios



FIGURA 4- *Hymenaea courbaril* (Lorenzi, 1992)

longitudinais mais carregados sendo muito empregada nas construções pesadas, obras hidráulicas, carroçaria, móveis, engenhos, postes, esteios, vigas, tonéis, etc. Com a casca que é grossa, os índios faziam leves canoas (Rizzini, 1978; Carneiro, 1989).

O jatobá é um vegetal dotado também de propriedades medicinais, tanto a casca, como a polpa do fruto e a resina excretada pelo tronco e ramos. Esta última conhecida por “resina animada”, “goma copal”, “copal do Brasil”, é solúvel em óleo mineral fervente, à 180°C. É recolhida do solo a volta das árvores velhas da floresta, dando blocos de até 3 quilos, e é recomendada contra as hemoptises, fraqueza geral, tosses, bronquites, asma, fraqueza pulmonar, laringites, etc. A casca em cozimento origina um extrato utilizado para combater as hemoptises, hematúrias, diarréias, disenteria, cólicas e várias outras enfermidades. Da resina também se obtém, no Brasil, o famoso “vinho de jatobá”, poderoso fortificante. Carneiro (1989) estudando casca da *Hymenaea martiana* (Hayne), identificou glicosídeos (flavonóides) com atividades farmacológicas.

A *Hymenaea courbaril* ocorre comumente nas florestas secas semidécidas, desde o Piauí até São Paulo, onde se sobressai pela altura e espessura do tronco, não ocorrendo em cerrados (Rizzini, 1978).

A fonte escolhida para este trabalho foi sementes de jatobá, pois estudos anteriores realizados pelo grupo de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná estabeleceram a estrutura parcial desta xiloglucana, bem como dos oligossacarídeos que foram obtidos após tratamento com celulase Bioferm (Lima *et al.*, 1993, 1995; Souza-Lima, 1997).

## **II-OBJETIVOS**

Conforme evidenciado na literatura apresentada, os oligossacarídeos de xiloglucana tem demonstrado papel importante no processo de crescimento celular. Este trabalho foi realizado com o objetivo de se obter uma série de oligossacarídeos de xiloglucana e, em seguida, testar a atividade biológica dos mesmos, de acordo com os itens abaixo:

- 1-Extração exaustiva dos polissacarídeos do endosperma e do tegumento.
- 2-Purificação da xiloglucana do endosperma.
- 3-Obtenção dos oligossacarídeos por hidrólise enzimática.
- 4-Purificação e análise estrutural dos oligossacarídeos obtidos.
- 5-Verificar o efeito dos oligossacarídeos de xiloglucana sobre o crescimento de coleótilos mediado ou não por 2,4-D.
- 6-Determinar as atividades hidrolases, induzidas pelos oligossacarídeos de xiloglucana, em protoplastos e células de *Rubus fruticosus*.
- 7-Determinar as curvas de dose dependência para as atividades  $\alpha$ -D-xilosidase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -L-fucosidase induzidas pelos oligossacarídeos de xiloglucana.
- 8-Verificar o efeito de XXLGol sobre a atividade  $\beta$ -1,4-glucanase induzida por 2,4-D e GA<sub>3</sub>.
- 9-Evidenciar a atividade XET em protoplastos de *R. fruticosus*.
- 10-Determinar o efeito de XXLGol sobre a indução  $\alpha$ -L-fucosidase mediada por ácido salicílico.
- 11-Determinar as curvas de tempo para a indução  $\alpha$ -L-fucosidase.
- 12-Verificar o efeito dos oligossacarídeos de xiloglucana sobre a resposta  $\alpha$ -L-fucosidase induzida por 2,4-D e GA<sub>3</sub>.

### **III-MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1-MÉTODOS GERAIS

As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório a vácuo, à temperaturas abaixo de 50°C.

As determinações espectrofotométricas para região do UV-visível, foram realizadas em aparelho Beckman DU 70 e Beckman DU-640.

As amostras foram liofilizadas em aparelho Virtis modelo 10-340.

As análises de cromatografia em papel (CP) foram realizadas em papel Whatman nº 1, pela técnica ascendente com o seguinte solvente e revelador:

- Benzeno-*n*-butanol-piridina-água (1:5:3:3 v/v, fase superior) usando-se como revelador solução de nitrato de prata (Trevelyan *et al.*, 1950).
- As análises de cromatografia em camada delgada (TLC) foram realizadas em placa de sílica gel, pela técnica ascendente com o seguinte solvente e revelador:
- Acetonitrila-água (6:4 v/v), usando-se como revelador ácido sulfúrico com aquecimento a 100°C.

As análises por cromatografia líquido-gasosa (CG) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC-14A, com detector de ionização de chama, utilizando-se nitrogênio como gás de arraste, fluxo de 30 mL/min. Uma coluna 3% de OV-225 sobre gás chrom Q de 100 a 200 mesh, 170 x 2 mm (d.i.), foi utilizada com detetor a 250°C. A temperatura da coluna foi de 170 °C para acetato de alditóis. A quantificação dos produtos analisados foi feita utilizando um integrador - processador C-R5A.

As análises por espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) e próton (RMN-<sup>1</sup>H), foram realizadas em aparelho Bruker AC-300 acoplado ao transformador de Fourier. As amostras foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O em um tubo de 0,5 cm de diâmetro [2 mg/mL (<sup>1</sup>H) e 10 mg/mL (<sup>13</sup>C)]. Os experimentos foram

realizados para  $^{13}\text{C}$  à 75 MHz e  $^1\text{H}$  à 300 MHz. Os deslocamentos foram expressos em  $\delta$ , relativos a ressonância de um padrão de acetona  $\delta$  2,03 ( $^1\text{H}$ ) e  $\delta$  29.80 ( $^{13}\text{C}$ ) para o sinal de um padrão de  $\text{Me}_4\text{Si}$  à 333 K e 303 K, respectivamente.

As determinações de FAB-MS positivo foram realizadas em aparelho quadripolar NERMAG R.10.10.C, ligado a um computador PDP 11-73, utilizando-se glicerol ou glicerol + NaCl como matriz.

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), usando-se como padrão glucose (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 490 nm). Os teores de açúcar redutor foram determinados pelos métodos de Somogyi e Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945), usando-se como padrão glucose (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 535 nm) e segundo Kidby e Davidson (1973), utilizando-se reagente de ferricianeto de potássio em meio básico (padrão de glucose a 125 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 420 nm)

Ácido urônico foi determinado pelo método de m-hidroxibifenil (Blumenkratz e Asboe-Hansen, 1973), usando-se como padrão ácido glucurônico (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 520 nm). Os grupos O-acetil foram determinados pelo método de Hestrin (Downs e Pigman, 1967) tendo como padrão glucose penta acetato (2,5  $\mu\text{moles}/\text{mL}$ ; 540 nm). Os teores de proteína foram quantificados com o reagente de Lowry modificado (Hartree, 1972), utilizando-se padrão de albumina de soro bovino (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 650 nm) e pelo método de Bradford (1976), utilizando-se Kit Coomassie Plus (Pearce, Illinois USA), e padrão de albumina de soro bovino (0,2 a 1,0  $\mu\text{g}$ , 595 nm).

## 2-MATERIAIS

A endoglucanase I, EGI, (121 ECU  $\text{mg}^{-1}$ ) de *Humicola insolens* e a endoxiloglucanase II, XG5, de *A. aculeata*, enzimas recombinantes, foram doadas pelo Dr.

Schülein (Novo Nordisk, Dinamarca), sendo a primeira obtida segundo Armand *et al.* (1997). A celulase comercial foi fornecida por Bioferm (Biobrás, Brasil). A Caylase 345 (mistura de celulase e hemicelulase obtida de *Trichoderma*) e Caylase M3 (mistura de pectinases obtidas de *Penicillium occitanis*) foram fornecidas por Cayla (Toulouse, França). A 2'-fucosil-lactose foi fornecida por Oxford Glycosystems (Coger, Paris, França). O nonassacarídeo XXFGol foi isolado de células em suspensão de *Rubus fruticosus*, pelo Dr. Gérard Chambat (CERMAV-CNRS) e doado para este trabalho. O metil trissacarídeo  $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)- $\beta$ -D-Galp-(1→2)-OMe- $\beta$ -D-Xilp foi preparado segundo Lopez *et al.* (1994) e doado pelo Dr. Fernandez-Mayoralas (Instituto de Química Orgânica General, CSIC, Madri, Espanha).

### 3-HIDRÓLISES ÁCIDAS TOTAIS

As hidrólises ácidas totais foram realizadas utilizando-se ácido trifluoracético (TFA) ou ácido sulfúrico, de acordo com os seguintes procedimentos:

a- Os polissacarídeos (10 mg) foram dissolvidos em 1 mL de água, aos quais adicionou-se TFA 2 M (1 mL); após 5 h em banho de água fervente, o ácido foi removido por evaporação a vácuo.

b- Os polissacarídeos (10 mg) foram dissolvido em 0,5 mL de ácido sulfúrico 72 % v/v, a solução foi mantida 4°C por 1 h, diluída para 8% e mantida a 100°C por 5 h. O ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário e o sulfato de bário resultante removido por filtração.

A redução dos produtos das hidrólises ácidas totais foi realizada em solução aquosa com NaBH<sub>4</sub>, a temperatura ambiente por 2 h. A reação foi interrompida com ácido acético e a solução tratada com resina Dowex (forma H<sup>+</sup>). A suspensão foi filtrada, o

filtrado evaporado a vácuo até a secura e o ácido bórico remanescente eliminado por codestilação com metanol (3 vezes). Os alditóis resultantes foram acetilados com a mistura de piridina:anidrido acético em volumes iguais (4 mL totais), a temperatura ambiente, por 16 h. A reação foi interrompida pela adição de gelo moído e os acetatos de alditóis foram extraídos com 2 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada, sequencialmente, com água, sol. de  $\text{CuSO}_4$  5% até completa remoção da piridina e, novamente, com água. Após secagem a vácuo, os produtos foram analisados e quantificados por CG.

#### 4-OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Hymenaea courbaril* foram colhidas no campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

#### 5-OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

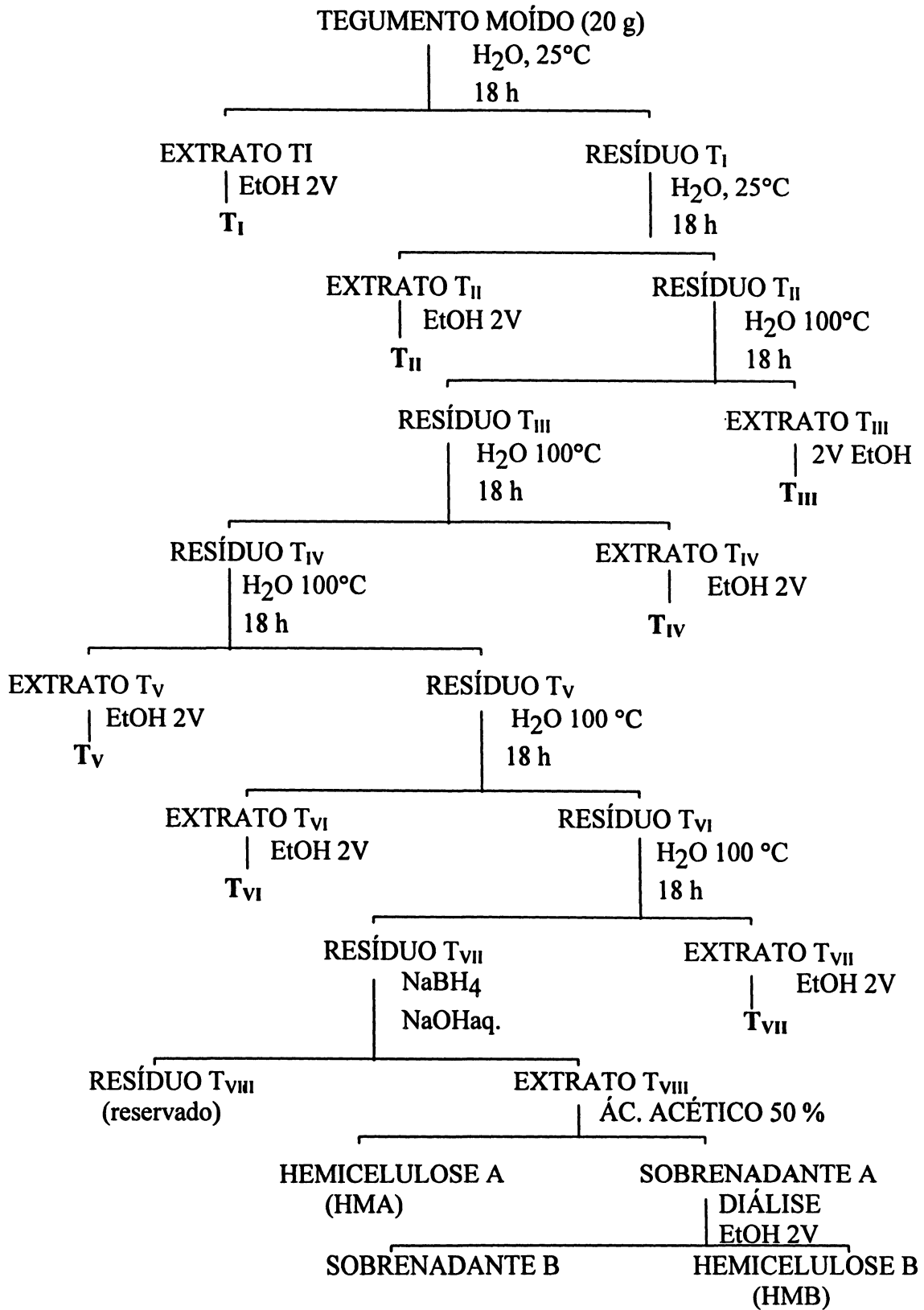
As sementes (65 g) foram fervidas por 20 min em água (200 mL), após repouso de 18 h a temperatura ambiente, o endosperma foi separado do tegumento.

Os tegumentos moídos (20 g) foram submetidas a seqüência de extração descrita no Esquema 1. As extrações foram realizadas após os tegumentos terem sido deslipidificados durante 48 h em aparelho Soxhlet com uma mistura de benzeno-etanol (2:1 v/v). Os endospermas secos foram moídos (35 g) e tratados conforme o Esquema 2.

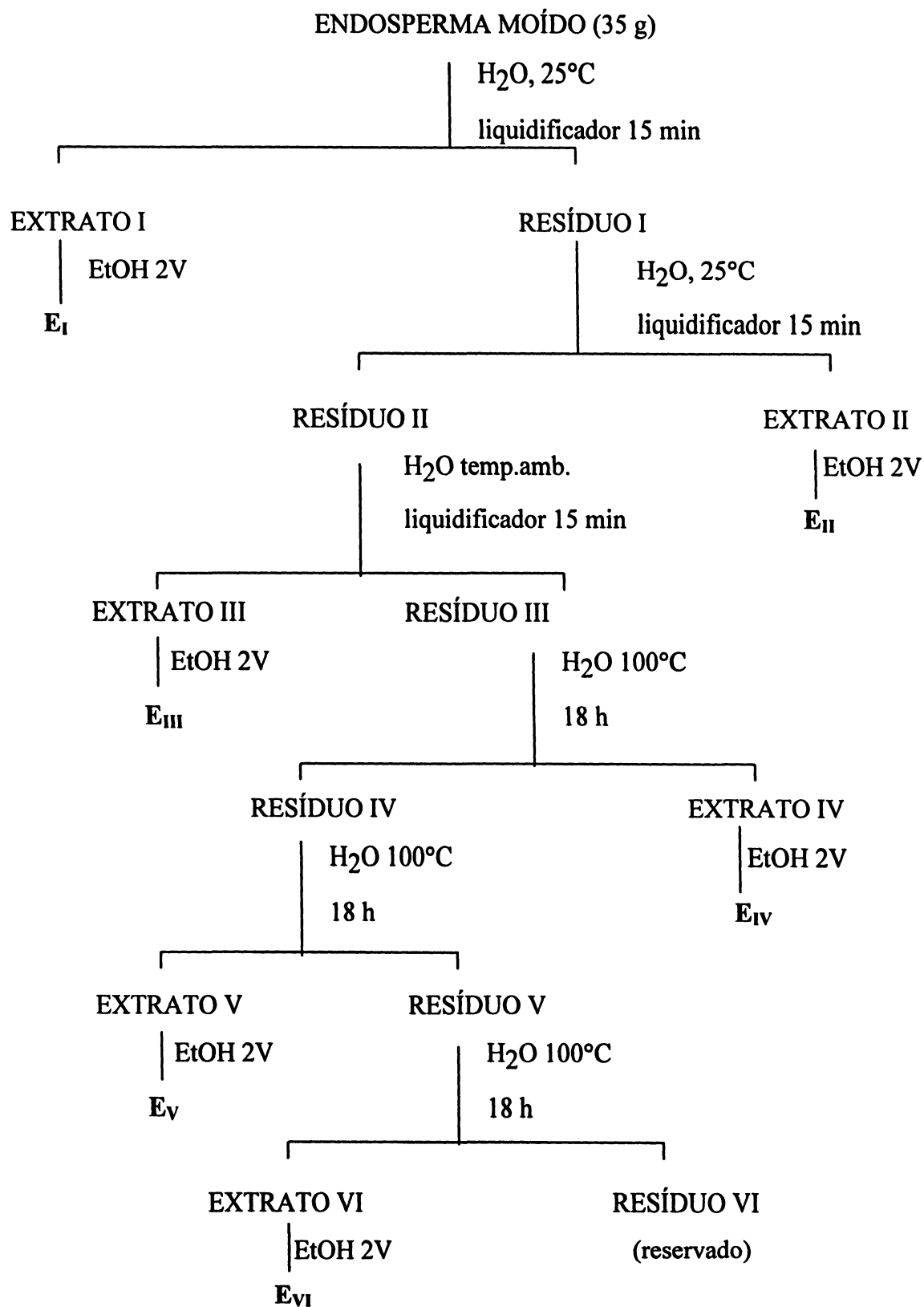
#### 6-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO $E_{III}$ COM CELULASE COMERCIAL.

A fração  $E_{III}$  (100 mg; Esquema 2) foi solubilizada em água (25 mL), após adicionado 3 mL de tampão acetato 0,5 M, pH 5, solução de celulase (2 mL; 10 mg/mL; 13 unidades/mL). O sistema foi incubado a 37°C. Paralelamente, fez-se um controle, contendo

ESQUEMA 1 - OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO TEGUMENTO DA SEMENTE DE *Hymenaea courbaril*.



ESQUEMA 2 - OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE *Hymenaea courbaril*.



água, tampão e enzima e outro contendo água, tampão e substrato. Da amostra incubada foram retiradas alíquotas nos tempos zero, 24, 48, 60 horas e realizadas dosagens de açúcar redutor e CP, a fim de monitorar a hidrólise. Após 60 h a amostra foi precipitada com etanol (3 vol.) e centrifugada. No precipitado foi dosado açúcar total. O sobrenadante foi concentrado e os oligossacarídeos contidos nesta amostra foram isolados, inicialmente por CP, obtendo-se as frações Hc-1, Hc-2, Hc-3, Hc-4 e Hc-5.

#### 7-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO E<sub>III</sub> COM ENDOGLUCANASE I (EGI)

A fração E<sub>III</sub> (200 mg; Esquema 2) foi solubilizada em água (40 mL). Após a adição de 5 mg de EGI, o sistema foi incubado a 37°C, sendo retiradas alíquotas de 0,25mL nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h, nas quais foram feitas dosagens de açúcar redutor. Após 96h a reação enzimática foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5 min, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi concentrado e liofilizado (fração H<sub>EGI</sub>).

#### 8-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO E<sub>III</sub> COM ENDOXILOGLUCANASE II (XG5)

A fração E<sub>III</sub> (200 mg; Esquema 2) foi solubilizada em água (40 mL). Após a adição de 5 mg da enzima XG5, o sistema foi incubado a 37°C, sendo retiradas alíquotas de 0,25 mL nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h, nas quais foram feitas dosagens de açúcar redutor. Após 96 h a reação enzimática foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5 min, seguido de centrifugação, e concentração e liofilização do sobrenadante (fração H<sub>XG5</sub>).

## 9-CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEACÃO (GPC)

a) Em BIOGEL-P2 - Aliquotas contendo 50 mg/mL das frações H<sub>EGI</sub> e H<sub>XG5</sub> foram filtradas em membrana de nitrato de celulose (0,45 µm) e aplicadas em coluna de Biogel-P2 (210cm x 1,5 cm; 60°C) eluídas com H<sub>2</sub>O destilada, fluxo 0,5 mL/min, controlado por bomba peristáltica Milton-Roy. O perfil de eluição foi registrado com refratômetro diferencial Waters R 403.

b) Em coluna HW 40F/50F - As frações Hc-1, Hc-2, Hc-3, Hc-4 e Hc-5 reduzidas com NaBH<sub>4</sub> foram cromatografadas em coluna de HW 40F/50F (50 x 1,6 cm; Interchim; 25°C), eluídas com água, fluxo 2 mL/min, com detecção refratométrica.

## 10-REDUÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

As frações H<sub>EGI</sub>, H<sub>XG5</sub>, Hc-2 e Hc-4 foram submetidas a redução com NaBH<sub>4</sub> por 2 h a temperatura ambiente. Após esse período foram tratadas com ácido acético, concentradas a securo e lavadas com metanol (3 vezes). As amostras reduzidas foram analisadas e/ou isoladas por GPC ou HPLC.

## 11-ISOLAMENTO DOS OLIGOSSACARÍDEOS POR HPLC

As frações H<sub>EGI</sub>-2 e H<sub>XG5</sub>-2 (3 mg/injeção; 25 injeções) foram filtradas em membrana de nitrato de celulose (0,3 µm), aplicadas em coluna de fase reversa nucleosil C-18 (25 x 0,46 cm) semi-preparativa distintas, eluídas com mistura de metanol:água, 7 ou 8 % de metanol, fluxo de 2 mL/min e detecção por índice de refração.

## 12-PREPARAÇÃO DE XILOGLUCANA MARCADA POR DIGOXIGENINA (DIG)

A xiloglucana (50 mg) foi solubilizada em água (50 mL), incubada com 26,8 U de galactose oxidase (obtida de *Dactylium dendroides*, Fluka), 267,97 U de catalase (obtida de fígado bovino, Sigma), 1 mL de sol. de CuSO<sub>4</sub> 1 mM, durante 3 dias a 30°C, com fluxo de oxigênio. O polissacarídeo oxidado foi tratado com NaBH<sub>3</sub>CN (3 mg), 0,6 mg de digoxigenina (DIG), em dimetil formamida (DMF) (80 µL), em tampão borato (1,6 mL, 0,2 M; pH 8,0), sob agitação, a 37°C durante 4 dias (Roy *et al.*, 1984).

As enzimas, catalase e galactose oxidase, foram desnaturadas utilizando-se SDS 2,5% e β-mercaptoetanol 5%, seguido de aquecimento (5 min; 100°C). Após filtração em Ultrafree PP 100 KDa (Millipore, Bredford, USA), para eliminação das proteínas, o polímero marcado com DIG foi recuperado e liofilizado.

## 13-PREPARAÇÃO DA NEOGLICOPROTEÍNA XXLG≈BSA

A ligação do oligossacarídeo XXLG à albumina de soro bovino (BSA) foi realizada pelo método de Roy *et al.* (1984), como já descrito para a xiloglucana~DIG. Solubilizou-se 2,5 mg de XXLG, 1,2 mg de BSA e 2 mg de NABH<sub>3</sub>CN em 500 µL de tampão borato (0,2 M, pH 8), deixando-se sob agitação por 4 dias. A neoglicoproteína foi recuperada por filtração, em uma membrana de 10 KDa (Ultrafree ME, Millipore, Bredford, USA). A membrana foi previamente saturada com BSA para evitar a fixação da neoglicoproteína.

## 14-TESTE DE CRESCIMENTO DE COLEÓPTILOS DE TRIGO

Os testes de crescimento foram realizados utilizando-se grãos de trigo. Inicialmente os grãos foram deixados em água durante 6 h, após foram selecionados e

colocados em placas de Petri (15-20 grãos por placa) sobre algodão embebido em meio nutritivo composto de sacarose 1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM; pH 6,1) e benzil potássio de penicilina 0,02%. As placas foram mantidas no escuro, a 25°C, por 3 dias, sendo acrescentado, diariamente, 15 mL de meio nutritivo por placa. Após este período os grãos foram selecionados de acordo com o comprimento de coleótilos (~15 mm) e redistribuídos em placas.

Iniciou-se os testes pelo acréscimo dos diferentes efetores ao meio nutritivo. Utilizou-se XXLGol (0,5; 1; 10; 50 e 100 nM) e XXFGol (0,5; 1; 10, 50 nM) e fucosil-lactose (1;10;100 nM) associados a 2,4-D 1  $\mu\text{M}$  ou não. Utilizou-se como controle uma amostra tratada apenas com o meio nutritivo. No total foram analisadas 35 placas. Os coleótilos foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital nos tempos 0, 24, 48 e 62 horas. A variabilidade na elongação de 15-20 segmentos de cada placa foi medida usando o teste t,  $p < 0,05$ . Cada ponto nas curvas obtidas representa a média entre 30-40 medidas  $\pm$  o desvio padrão para cada amostra. A taxa de crescimento foi medida entre 10 e 20 h e expressa como  $\Delta L$  em mm. Os controles apresentaram um crescimento absoluto de 3,87 mm, ao qual foi atribuído o valor 0 ( $\Delta L = 0$ ), sendo este descontado das amostras. Nos resultados obtidos sem 2,4-D os valores de  $\Delta L$  foram relacionados com o logaritmo na base 10 da concentração do oligossacarídeo.

Os resultados obtidos com 2,4-D (1  $\mu\text{M}$ ) foram expressos pela percentagem de inibição ou ativação do crescimento estimulado por 2,4-D que foi calculado com o auxílio da fórmula:

$$\%I \text{ ou } A = \frac{L_{(2,4-D + \text{oligo})} - L_{(2,4-D)}}{L_{(2,4-D)} - L_{(\text{con.})}} \times 100\% \text{ onde:}$$

$L_{(2,4-D)}$  = comprimento em mm de coleótilo tratado apenas com 2,4-D;

$L_{(2,4-D + \text{oligo})}$  = comprimento em mm de coleótilo tratado com oligossacarídeo + 2,4-D.

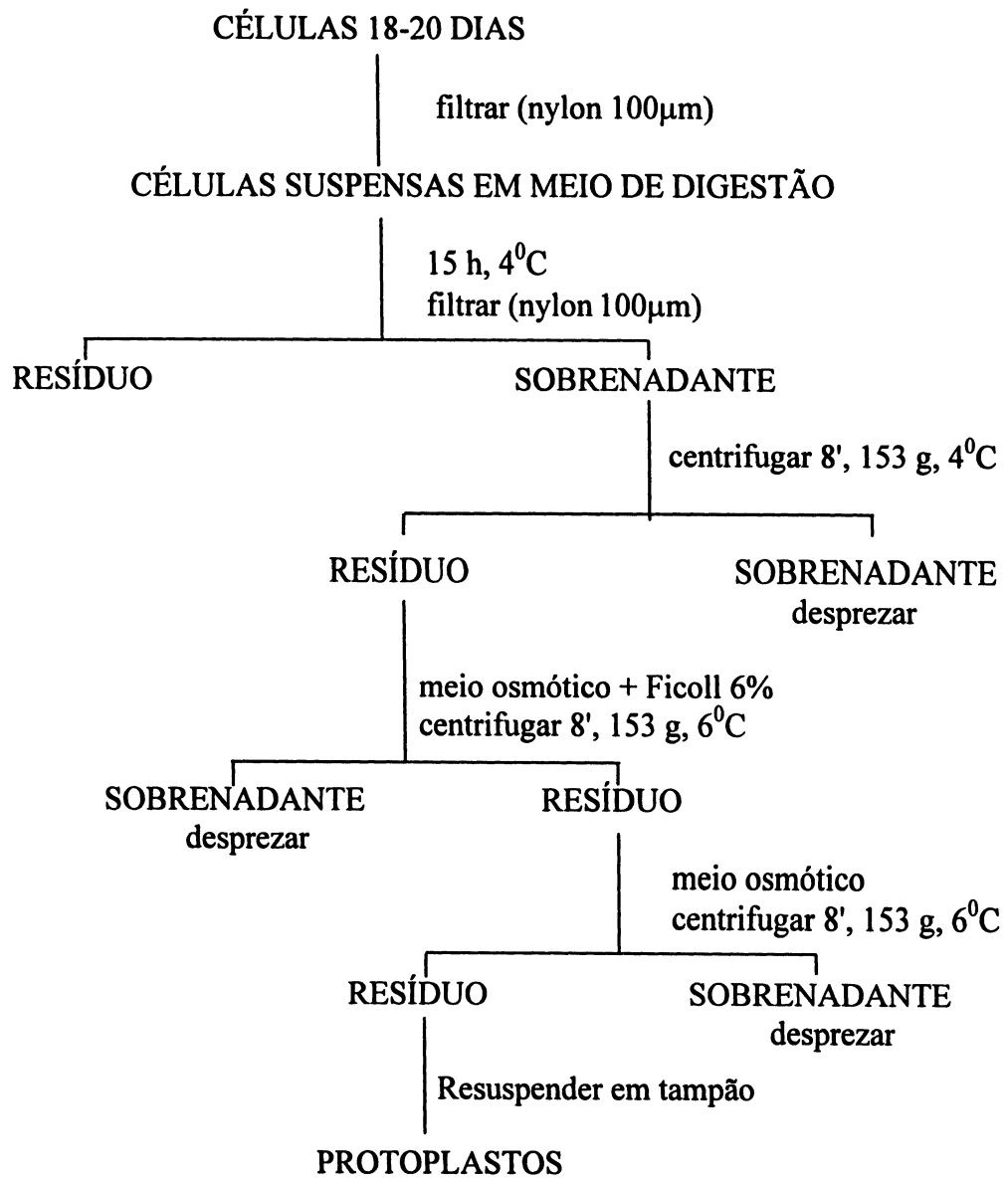
$L_{(\text{con.})}$  = comprimento em mm de coleótilo tratado apenas com meio nutritivo.

## 15-PREPARAÇÃO DE CÉLULAS E PROTOPLASTOS DE *Rubus fruticosus*

Utilizou-se células frescas de *Rubus fruticosus* cultivadas *in vitro* por técnica de suspensão celular padronizada no CERMAV por Hustache *et al.* (1975) e atualmente realizada por M.F. Marais. As células foram crescidas em meio de Heller (1953) sob agitação (agitador AS 850 Biolafitte), a 75 rpm, 25°C, sob iluminação durante 12 h (2000lx). As células foram retiradas na fase exponencial de crescimento, após 15-18 dias de replicação, isoladas por centrifugação (4000 g, 5 min), lavadas com meio de Heller e ressuspendidas em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,9) contendo 2% de sacarose, 4mM de ácido etilenoglicol-bis-β-aminoetil éter-*N-N-N'-N'*-tetra-acético (EGTA), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0.06 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Os protoplastos foram preparados a partir das células (40 g) de 18-20 dias (Esquema 3; pg. 48). As células foram filtradas em membrana de 100 μm, lavadas com meio de Heller, ressuspendidas em meio de Heller enriquecido com manitol 0,56 M e sacarose 0,06M, contendo também Caylase 345 (0,25% p/v) e Caylase M3 (0,01% p/v), distribuídas em placas de Petri e incubadas 18 h a 4°C. Os protoplastos foram recuperados por filtração em membrana de 100 μm, centrifugados a 153 g, 8 min, 4°C. O precipitado foi suspenso no meio precedente, porém sem Caylase (meio osmótico) contendo 6% de Ficoll 400 (Sigma) e centrifugado novamente nas condições acima. O sobrenadante foi desprezado e os precipitados foram ressuspendidos em meio osmótico e centrifugados novamente. A seguir os precipitados (protoplastos) foram reunidos e suspensos em meio osmótico. Após a análise da viabilidade e contagem foram submetidas aos experimentos de indução.

ESQUEMA 3 - OBTENÇÃO DOS PROTOPLASTOS DE *Rubus fruticosus*.



### 15.1-CONTAGEM E VIABILIDADE

A contagem das células e/ou protoplastos foi realizada em câmara de Neubauer (Bioblock) com utilização de microscópio. A viabilidade dos protoplastos foi acompanhada durante os bioensaios utilizando o azul de Evans, segundo o método de Kanai e Edwards (1973): 20 mL de azul de Evans a 1% (m/v) foram adicionados à 200 mL de suspensão de protoplastos. A percentagem de protoplastos viáveis é dada pelo número de protoplastos não corados por 100 protoplastos contados; para cada controle de viabilidade 2000 protoplastos são contados.

### 16-BIOENSAIOS

Os protoplastos ou células ( $2 \times 10^6$ ) foram suspensos, sob agitação, em 25mL de tampão Bis-Tris/HCl (25 mM; pH 4,8) contendo manitol 0,56 M, sacarose 0,06 M, KCl 10 mM e  $\text{CaCl}_2$  1 mM, em presença ou não de efetores, a temperatura ambiente, em diferentes intervalos de tempos. Os efetores usados foram os oligossacarídeos XXGol, XLGol, XXXGol, XXLGol, XXFGol, FucXilGlu e fucosil lactose em concentrações até 100 nM, o polímero (xiloglucana de *H. courbaril*) em concentração até 100 nM, sendo esta sua concentração relacionada ao mol da unidade repetitiva XXLG, os hormônios 2,4-D e  $\text{GA}_3$  (10, 50 e 100 nM); cicloheximida (1  $\mu\text{M}$ ), actinomicina D (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e ácido salicílico (50 mM).

As incubações foram interrompidas colocando-se as amostras em gelo e as células recuperadas por decantação. As soluções de protoplastos foram centrifugadas a 4°C, 8 min, 2300 g. Os protoplastos recuperados por centrifugação ou as células obtidas por decantação, foram ressuspensos em tampão para glicohidrolases (tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,2).

## 17-PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL

Os protoplastos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,5) contendo sacarose 0,25 M e ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA) 1 mM a 0°C utilizando-se sonicador (Branson-B12) a 50 w (6 vezes, 30 s). Os protoplastos homogeneizados foram centrifugados a 4°C (12.000 g, 30 min), e o sobrenadante centrifugado novamente, a 4°C (100.000 g, 120 min), em ultracentrifuga Beckman L2-65B, utilizando um rotor SW28. Os microssomos obtidos foram ressuspensos em uma solução de conservação da enzima XET, contendo CaCl<sub>2</sub> (1 mM) e *N-N*-bis-(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina (espermina, 1 mM).

## 18-EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MEMBRANA

As frações membranárias foram solubilizadas a partir da fração microssomal. Os resíduos da ultracentrifugação foram suspensos em 9 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,2), contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 5 mM, ABSF 0,5 mM e CHAPS 1%, sonicados (40 w, 5 vezes, 30 s). Após a sonicação verificou-se, ao microscópio, o nível de dissociação das membranas. As amostras foram ultracentrifugadas a 4°C (100.000 g, 120 min). Os resíduos foram suspensos em 200 mL de solução de conservação da atividade XET, contendo MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> todos a 1 mM.

## 19-DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES GLICOHIDROLASES

### 19.1-Extração e dosagem das proteínas

As proteínas foram extraídas por sonicação das soluções de protoplastos ou células tratadas ou não com os efetores. As extrações foram realizadas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,2) contendo NaCl 1M, sendo que para as extrações das misturas protéicas visando a determinação da atividade  $\alpha$ -amilase foi acrescido CaCl<sub>2</sub> 1 mM à

solução. Cada amostra foi sonicada 4 vezes (60 W; 25 s), a seguir foram centrifugadas a 4°C (12.000 g, 15 min) e os sobrenadantes foram dialisados em unidades de ultrafiltração (Ultrafree™ Millipore de 10 KDa). As proteínas obtidas, em cada amostra, foram ressuspensas em água (2 mL) e quantificadas, utilizando-se Kit Coomassie Plus (Pearce).

### 19.2-Ensaio das glicohidrolases

Os ensaios das atividades enzimáticas foram realizados como descrito a seguir:

As atividades  $\alpha$ -L-fucosidase (E.C. 3.2.1.51; substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucosídeo),  $\beta$ -D-xilosidase (substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilosídeo),  $\alpha$ -D-xilosidase (substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-xilosídeo),  $\beta$ -D-galactosidase (substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo) foram testadas em placa Elisa K, utilizando 20  $\mu$ L de substrato (2 mg/mL) e 80  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo 1  $\mu$ g de enzima. O sistema foi incubado a 40°C, a reação foi interrompida com 100  $\mu$ L de carbonato de sódio 0,1 M. A atividade foi determinada pela medida da absorbância dos íons *p*-nitrofenolato a 410 nm, de acordo com Lee e Leikus (1993). Para cada efator analisado foram realizados três experimentos de indução independentes, sendo cada ponto da cinética dosado em triplicata. As curvas das cinéticas foram traçadas de acordo com a regressão polinomial de 2ª ordem.

As velocidades das reações enzimáticas foram calculadas a partir das equações das retas, usando software Excel. A ativação foi expressa como R, o qual é a relação entre a inclinação das curvas obtidas pelas amostras de protoplastos tratados com efetores contra os controles (protoplastos suspensos em tampão sem efetores). Brancos (sem enzimas ou sem substratos) foram realizados para cada amostra.

Através da dosagem de açúcar redutor mediu-se as atividades  $\beta$ -(1,4)-D-glucanase (substrato *O*-Me- $\beta$ -celotetraosídeo), laminarinase (E.C. 3.2.1.39, 3.2.1.84; substrato laminarina), quitinase (E.C. 3.2.1.14; substrato 4-metil-umbeliferinil- $\beta$ -D-*N,N',N''*-triacetilquitosídeo) e galacturonase (E.C. 3.2.1.15; substrato ácido poligalacturônico). Foram incubados 25  $\mu$ L de substrato (2 mg/mL) com 75  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1 M contendo 2  $\mu$ g de enzima, a 37°C. As reações foram interrompidas pelo acréscimo do reagente de ferrocianeto de potássio em meio básico (300  $\mu$ L) para dosagem de açúcar redutor, leitura a 420 nm.

A atividade  $\alpha$ -amilase (E.C. 3.2.1.1; substrato pentassacarídeo bifluorescente, Payre *et al.*, 1995) foi determinada em espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50, pela excitação da amostra a 290 nm e medida da intensidade de emissão de fluorescência a 490 nm. Foram utilizados 15  $\mu$ g de enzima em tampão fosfato de potássio 0,1 M; pH 7, contendo  $\text{CaCl}_2$  1 mM. As medidas foram realizadas durante 30 min, com leitura a cada 1 s.

Foram realizados os ensaios de dose dependência para as atividades  $\alpha$ -L-fucosidase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -D-xilosidase,  $\beta$ -D-galactosidase e (1,4)- $\beta$ -D-glucanase para os efetores com resposta mais significativa (concentrações até 100 nM; 15 min). As atividades foram medidas e quantificadas de acordo com os métodos descritos acima.

A atividade da  $\alpha$ -L-fucosidase foi analisada em função do tempo de incubação dos protoplastos ou células (5, 10, 15, 20, 30, 45 min; 6, 24 e 36 h) com XXLGol, XXXGol, XXFGol e o trissacarídeo *O*-metil-FucGalXil em suas concentrações mais efetivas, associados ou não a actinomicina D (1  $\mu$ g/mL) e cicloheximida (1  $\mu$ M).

Foi determinada a atividade  $\alpha$ -L-fucosidase induzida por 2,4-D e  $\text{GA}_3$  (10, 50, 100 nM) associados ou não aos oligossacarídeos XXLGol, XXXGol, XXFGol e o

trissacarídeo *O*-metil-FucGalXil em concentração de 0,01 a 100 nM. O resultado foi expresso em percentagem de ativação calculada em função de **R**, que é a relação entre a ativação obtida por cada amostra isolada e o controle em água. A percentagem de ativação foi determinada pela fórmula:

$$\%A \text{ ou } I = R_{(2,4-D \text{ ou } GA_3 + OLIGO)} - R_{(2,4-D \text{ ou } GA_3)} / R_{(2,4-D \text{ ou } AG_3)} \times 100\% \text{ onde:}$$

$$R_{(2,4-D \text{ ou } GA_3)} = R \text{ obtido pela indução com 2,4-D ou com } GA_3;$$

$$R_{(2,4-D \text{ ou } GA_3 + OLIGO)} = R \text{ obtido pela indução com oligossacarídeo + 2,4-D ou } GA_3.$$

A atividade da  $\alpha$ -L-fucosidase foi determinada também quando da indução dos protoplastos com XXLGol e *O*-metil-FucGalXil (concentrações até 100 nM) e/ou ácido salicílico (5, 10, 50 nM) em 15 min de incubação. Os resultados de ativação foram expressos em R em relação ao logaritmo da concentração de oligossacarídeo.

A atividade (1,4)- $\beta$ -D-glucanase foi analisada em função da indução com XXLGol e *O*-metil-FucGalXil e/ou 2,4-D e  $GA_3$  (10 e 100 nM). Os resultados foram expressos em % de inibição como calculado para a atividade da  $\alpha$ -L-fucosidase.

## 20-DOSAGEM XET

A atividade XET foi determinada utilizando-se os testes ELISA cinética dependentes, de acordo com o método de Tsang *et al.* (1983). O oligossacarídeo XXLGol~BSA (0 a 200 nM de XXLG) em 100  $\mu$ L água, foi imobilizado nos poços da placa de ELISA durante 2 h (Sone e Sato, 1994). A seguir, incubou-se a xilogluca (XG; 0,04  $\mu$ M), XG~DIG (0,004  $\mu$ M),  $MgCl_2$  (0,5 mM) e extrato enzimático (200 ng de proteína) em um volume de 230  $\mu$ L de tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 5,5) contendo

EGTA 500  $\mu$ M,  $\text{CaCl}_2$  750 mM,  $\text{MgCl}_2$  750  $\mu$ M a 37°C (0 a 90 min). A seguir os poços foram lavados com tampão PBS (10 mM, pH 7,4) e incubados sucessivamente com: anticorpo primário (IgG de carneiro anti-DIG; Boehringer, Mannheim, Alemanha) diluído 150 vezes em 200  $\mu$ L de tampão PBS durante 1 h sob agitação a temperatura ambiente; anticorpo secundário (IgG de asno anti IgG de carneiro; Sigma, St. Louis, EUA) marcado com peroxidase, diluído 1000 vezes em 200  $\mu$ L de tampão PBS, nas mesmas condições anteriores; por último utilizou-se um anticorpo terciário (IgG anti peroxidase de cabra; Jackson Immunoresearch, West Grove, EUA) marcado com peroxidase, diluído 1000 vezes em 200  $\mu$ L de tampão PBS. A seguir foi incubado com substrato para peroxidase (dihidroclorato de *O*-fenilenediamina 0,22 mg/mL e 0,67 mL/mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%) A atividade peroxidase foi determinada pela medida da absorbância a 492 nm com a utilização de um leitor de placas ELISA (MR 5000, Dynatech, Chantilly, USA). Após cada etapa os poços foram lavados com tampão PBS e 3 a 4 vezes. Os controles foram realizados utilizando-se poços sem enzima e com enzima fervida.

## **IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1-OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS SEMENTES DE

### *Hymenaea courbaril*

O estudo dos polissacarídeos de sementes de leguminosas vem sendo desenvolvido há vários anos pelo grupo de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná. Dando continuidade aos estudos anteriores (Lima *et al.*, 1993; 1995), as sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá) foram escolhidas como fonte de oligossacarídeos, por fazerem parte do projeto deste grupo.

No presente trabalho de tese foi realizada uma abordagem geral dos polissacarídeos e oligossacarídeos do tegumento, além do isolamento, caracterização estrutural e determinação da atividade biológica dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática da xiloglucana do endosperma de *Hymenaea courbaril*.

O isolamento dos polissacarídeos das sementes de *H. courbaril* foi realizado a partir dos tegumentos e endospermas isolados. As sementes foram fervidas, a fim de inativar-se as enzimas que poderiam degradar os diferentes polissacarídeos, a seguir foram deixadas em repouso em água até o entumescimento. Os tegumentos e endospermas foram, então, separados manualmente.

Os tegumentos moídos, após tratamento com benzeno-etanol em Soxhlet a fim de eliminar lipídeos, ceras e pigmentos, foram submetidos a extrações aquosas seqüenciais e alcalina. (Esquema 1, Materiais e Métodos, pg. 41; Tabela I e II). Os extratos aquosos foram tratados isoladamente com 2 volumes de etanol, obtendo-se as frações T<sub>I</sub>, T<sub>II</sub>, T<sub>III</sub>, T<sub>IV</sub>, T<sub>V</sub>, T<sub>VI</sub>, T<sub>VII</sub>. Os sobrenadantes etanólicos foram evaporados a vácuo até um volume de 10 mL e analisados por CP, obtendo-se uma mistura de monossacarídeos e oligossacarídeos livres constituída principalmente por arabinose e xilose. Os resíduos das extrações aquosas foram tratados com hidróxido de sódio aquoso, dando origem as hemiceluloses A e B (Esquema 1, Materiais e Métodos, pg. 41; Tabelas I e II).

TABELA I - COMPOSIÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA E ALCALINA DO TEGUMENTO DAS SEMENTES DE *Hymenaea courbaril*.

FRAÇÕES	ÁCIDO URÔNICO <sup>a</sup> g%	AÇÚCAR TOTAL <sup>b</sup> g%	PROTEÍNA <sup>c</sup> g%	GRUPOS ACETIL <sup>d</sup> g%
T <sub>I</sub>	10,8	67,2	13,5	3,2
T <sub>II</sub>	6,3	52,4	12,0	2,5
T <sub>III</sub>	17,2	65,4	15,5	1,7
T <sub>IV</sub>	19,0	61,5	16,6	2,9
T <sub>V</sub>	21,9	63,6	11,8	2,7
T <sub>VI</sub>	33,0	44,4	8,0	2,5
T <sub>VII</sub>	30,4	62,0	4,6	3,0
HMA	4,2	75,4	18,6	-
HMB	21,5	74,4	4,0	-

a - usando-se sol. de m-hidroxibifenil (Blumenkratz e Asboe-Hansen, 1973).

b- usando-se método fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) .

c- usando-se método de HARTREE (Hartree, 1972)

d- usando-se método de HESTRIN (Downs e Pigman, 1967)

TABELA II - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA E ALCALINA DO TEGUMENTO DAS SEMENTES DE *Hymenaea courbaril*.

FRAÇÕES	Rd*	COMPOSIÇÃO EM AÇÚCARES NEUTROS				
		RAM	ARA	XIL	GAL	GLU
T <sub>I</sub>	1,8	80,3	16,7	3,0	-	-
T <sub>II</sub>	0,5	81,2	11,6	7,2	-	-
T <sub>III</sub>	1,8	87,6	9,9	2,5	-	-
T <sub>IV</sub>	0,8	26,3	54,9	18,8	-	-
T <sub>V</sub>	1,4	40,6	42,5	16,9	-	-
T <sub>VI</sub>	1,0	44,8	48,1	7,1	-	-
T <sub>VII</sub>	0,5	57,1	33,6	9,3	-	-
HMA	6,5	11,2	9,6	56,4	7,6	15,2
HMB	4,7	5,1	3,9	81,8	4,0	5,3

CG - coluna OV-225

\* Rd- rendimento em relação a massa total de tegumento.

As frações polissacarídicas do tegumento (rendimento em relação ao tegumento total 19%) foram analisadas por CG na forma de acetato de alditóis. Verificou-se que todas as frações T são formadas por ramnose, arabinose e xilose. Apresentaram ácido urônico, proteína e grupos *O*-acetil. As frações T<sub>I</sub>, T<sub>II</sub> e T<sub>III</sub> apresentaram principalmente ramnose (~80 %). As frações, T<sub>I</sub> e T<sub>II</sub>, foram submetidas a fracionamento em coluna de DEAE-celulose forma Cl, sendo obtidas as frações T<sub>IH<sub>2</sub>O</sub> e T<sub>IIH<sub>2</sub>O</sub> que representam ~20% da massa inicial aplicada na coluna, e T<sub>INaOH</sub> e T<sub>IIINaOH</sub> ~60 % da massa inicial. As frações foram analisadas por CG na forma de acetatos de alditóis sendo que as frações T<sub>IH<sub>2</sub>O</sub> e T<sub>IIH<sub>2</sub>O</sub> são formadas principalmente por arabinose e nas frações T<sub>INaOH</sub> e T<sub>IIINaOH</sub> obteve-se ramnose como principal componente. Estas frações foram reservadas para estudos posteriores.

Os endospermas moídos (35g) foram submetidos a extração aquosa seqüencial em liqüidificador a temperatura ambiente e em seguida a 100°C por 18 h. Os extratos aquosos foram tratados, isoladamente, com 2 volumes de etanol e observou-se a precipitação dos polissacarídeos. As soluções foram centrifugadas dando origem as frações E<sub>I</sub>, E<sub>II</sub>, E<sub>III</sub>, E<sub>IV</sub>, E<sub>V</sub> e E<sub>VI</sub> (Esquema 2, Materiais e Métodos, pg. 42; Tabela III).

As frações E (rendimento em relação ao endosperma total de 83,7%) foram analisadas por CG na forma de acetato de alditóis, sendo formadas principalmente por xilose, galactose e glucose. A fração E<sub>I</sub> apresentou ainda pequena quantidade de arabinose e manose. A presença de manose nestas frações está em concordância com os resultados obtidos por Souza-Lima (1997), que isolou uma galactomanana das sementes de *H. courbaril*. A presença de maior quantidade de xilose na fração E<sub>I</sub> pode representar a contaminação por polissacarídeos advindos do tegumento.

A fração E<sub>III</sub> foi escolhida como fonte de xiloglucana para produção dos oligossacarídeos devido ao seu maior rendimento, e relação de Glu:Xil:Gal de 4,5:3:1,

TABELA III - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE *Hymenaea courbaril*.

FRAÇÕES	Rd*	COMPOSIÇÃO EM AÇÚCARES NEUTROS				
		ARA	XIL	MAN	GAL	GLU
	g%			g%		
E <sub>I</sub>	2,9	2,5	49,8	2,7	14,5	41,1
E <sub>II</sub>	27,3	tr	39,2	tr	11,2	39,0
E <sub>III</sub>	31,4	tr	33,6	tr	11,9	54,7
E <sub>IV</sub>	10,5	3,1	29,3	-	13,6	54,1
E <sub>V</sub>	8,6	3,0	30,0	-	13,0	54,0
E <sub>VI</sub>	3,0	7,5	32,2	-	15,0	45,3

C.G. coluna OV-225

Rd- rendimento em relação a massa de endosperma seco.

semelhante a de xiloglucana de *Tamarindus indica*. Os oligossacarídeos produzidos a partir da xiloglucana de *T. indica* já estão bem caracterizado na literatura (Guidley *et al.*, 1991; York *et al.*, 1993).

A xiloglucana (fração E<sub>III</sub>) apresentou cerca de 5% de proteína sendo submetida a desproteínização pelo método de Sevag (Staub, 1965), por 5 vezes, restando após tratamento 1,2%. Após purificação foi analisada por RMN-<sup>13</sup>C (Fig. 1), apresentando os sinais na região de C-1 a  $\delta$  104,56,  $\delta$  102,55 e  $\delta$  99,13 correspondentes a  $\beta$ -D-Galp,  $\beta$ -D-Glup e  $\alpha$ -D-Xilp, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os apresentados na literatura para xiloglucana de *T. indica* e confirmam os obtidos por Lima *et al.* (1993) para xiloglucana de *H. courbaril*.

## 2-OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA XILOGLUCANA

Os oligossacarídeos de xiloglucana de *H. courbaril* foram obtidos por tratamento com diferentes enzimas: celulase comercial (Bioferm); endoglucanase do tipo I (EGI); endoxiloglucanase II (XG5), obtendo-se as frações Hc (hidrolisado com celulase), H<sub>EGI</sub> (hidrolisado com endoglucanase) e H<sub>XG5</sub> (hidrolisado com endoxiloglucanase), respectivamente.

A partir da hidrólise da xiloglucana com a celulase comercial foi obtida uma mistura de oligossacarídeos. Esta mistura foi isolada por CP produzindo, as frações Hc-1, Hc-2, Hc-3, Hc-4 e Hc-5. Estas frações foram reduzidas com NaBH<sub>4</sub> e dessalinizadas com resina. A fração Hc-4 reduzida foi gel-permeada em coluna preparativa HW40F/50F, por ser a fração de maior rendimento, a fim de completar-se a purificação dos oligossacarídeos desta fração. O oligossacarídeo Hc-4 foi analisado por FAB-MS sendo seu íon molecular m/z de 314, como mostra a Fig. 2B. Os sinais de (M + Na)<sup>+</sup> a m/z 337 e (M + H)<sup>+</sup> a m/z 315, sugerem tratar-se de um dissacarídeo. O resultado de FAB-MS foi confirmado pelas

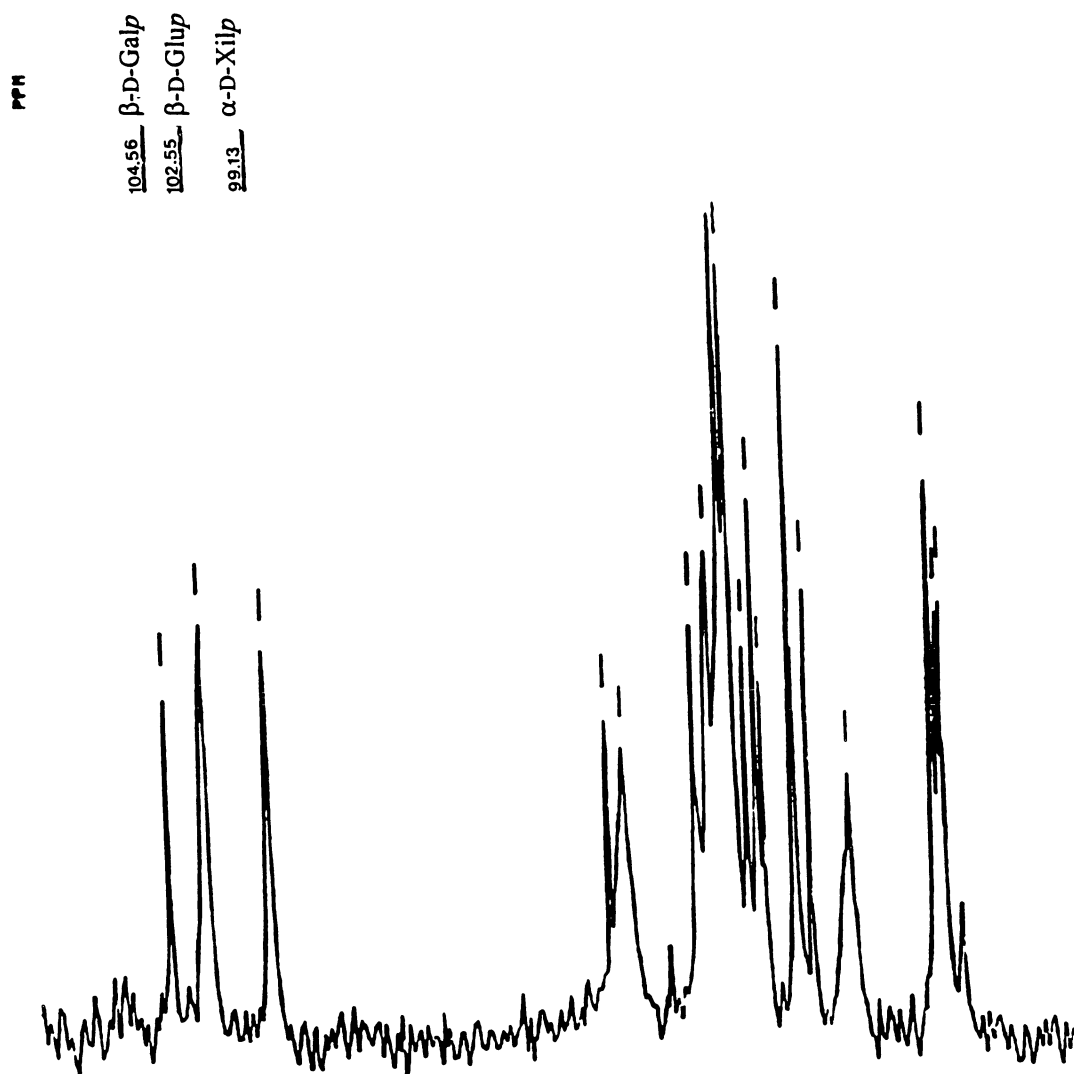


FIGURA 1– ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO E<sub>III</sub>, EM D<sub>2</sub>O, 75 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$  29,80).

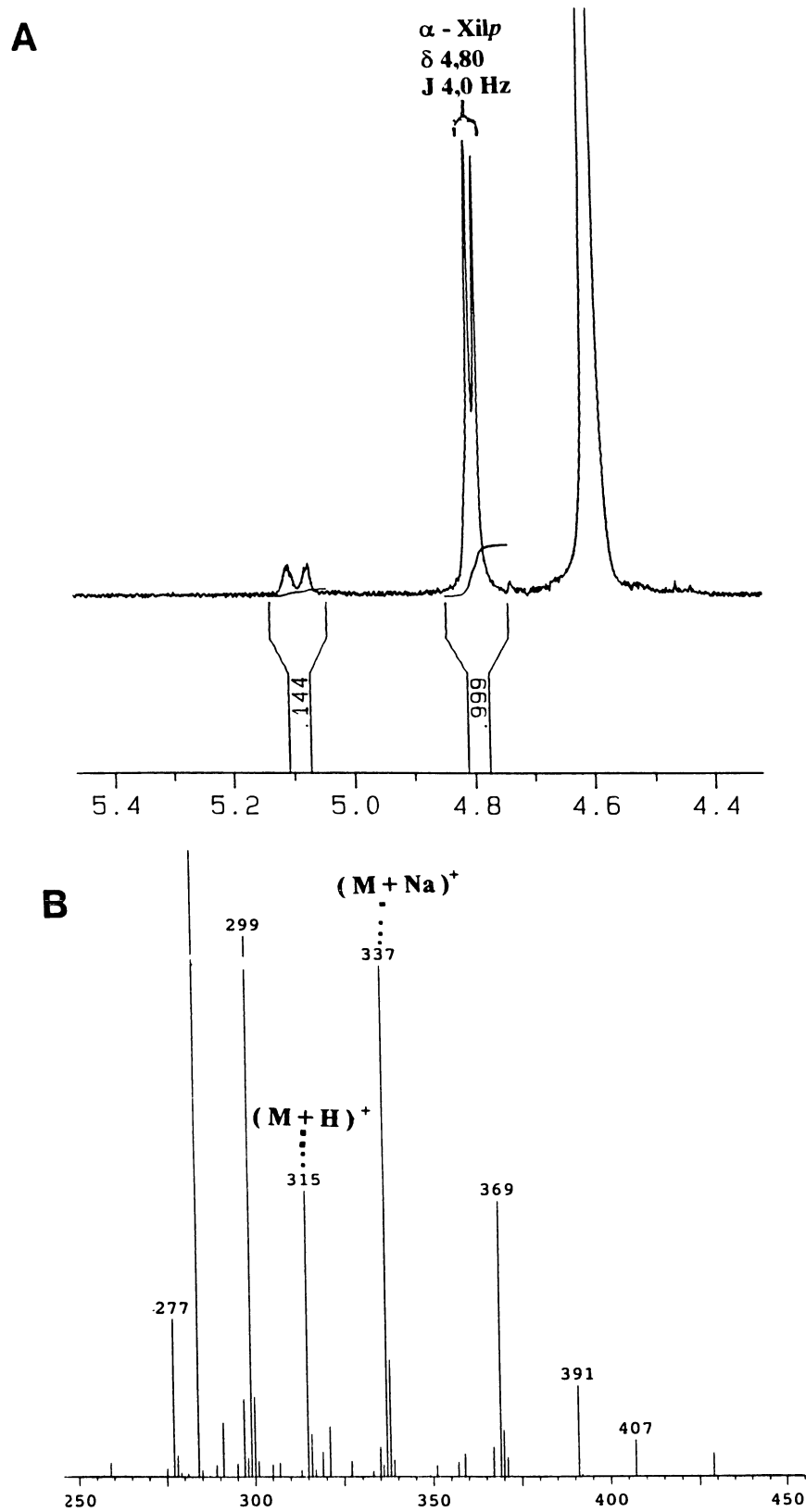


FIGURA 2 - ESPECTRO DO DISSACARÍDEO OBTIDO DA FRAÇÃO Hc-4. (B) DE FAB-MS POSITIVO; (A) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$  2,03).

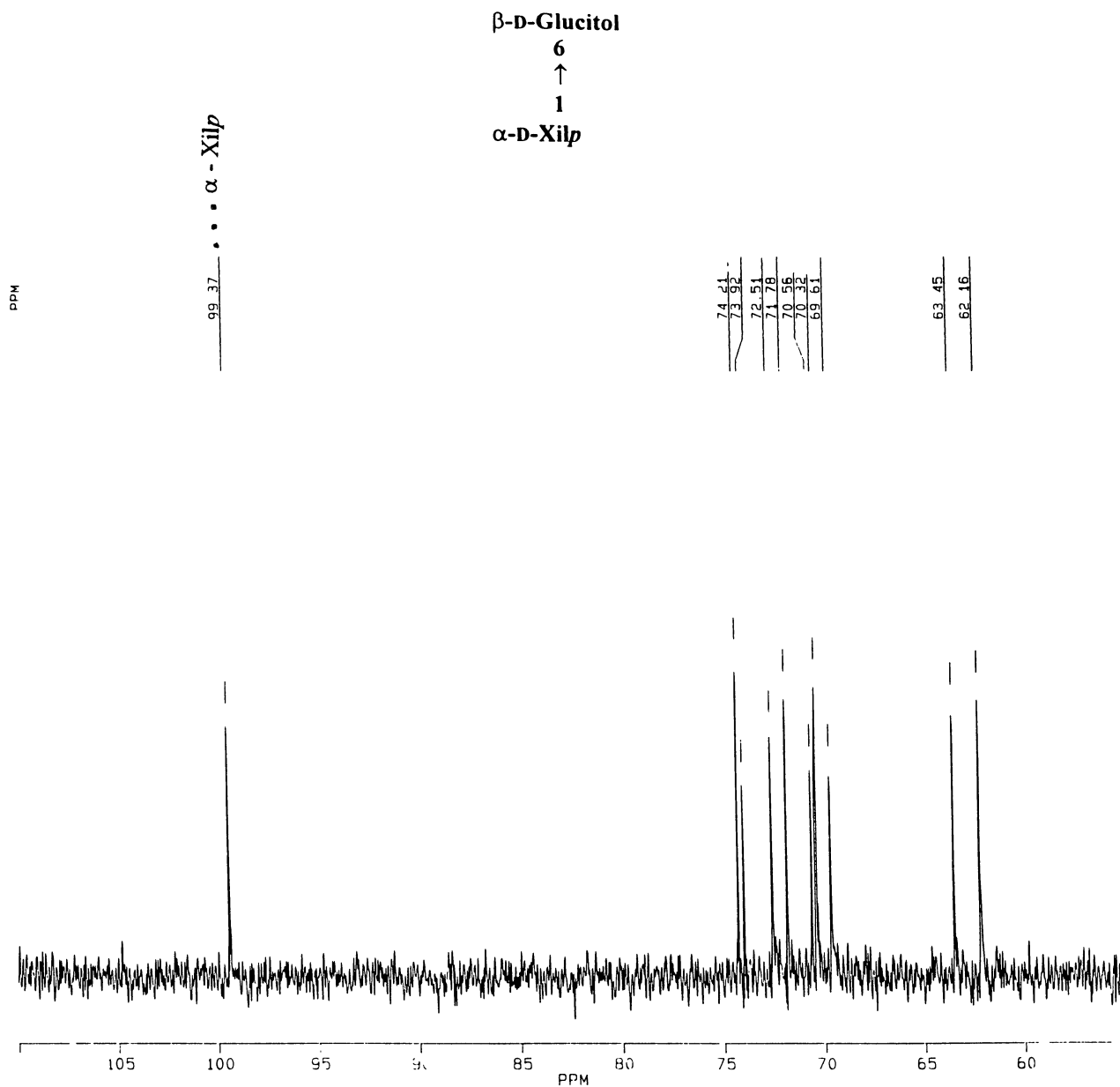


FIGURA 3 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO DISSACARÍDEO OBTIDO DA FRAÇÃO Hc-4, EM D<sub>2</sub>O, 75 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$  29,80).

análises espectroscópicas de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Fig. 2A e 3, respectivamente). O espectro de RMN-<sup>1</sup>H apresenta um duplete de H-1 a  $\delta$  4,80 que representa a  $\alpha$ -Xilp, indicando que trata-se do dissacarídeo de xilosilglucitol. Um deslocamento a campo baixo ( $\delta$  5,10) representa uma pequena contaminação pelo trissacarídeo GalXilGol, tendo o sinal de  $\beta$ -Galp a  $\delta$  4,40. No espectro de RMN-<sup>13</sup>C temos o sinal de C-1 de  $\alpha$ -Xilp a  $\delta$  99,37 e sinal de  $\beta$ -Galp do trissacarídeo contaminante a  $\delta$  104.

Analisando-se o perfil de hidrólise e os produtos obtidos com celulase comercial, verificou-se que estes oligossacarídeos não eram representativos da estrutura geral da xiloglucana, provavelmente devido a impureza da enzima com outras glicosidases. Assim, buscou-se outras enzimas para a obtenção dos oligossacarídeos, as quais não estavam disponíveis no primeiro momento do trabalho.

A xiloglucana foi submetida a novas séries de hidrólises enzimáticas utilizando-se EGI e XG5. A hidrólise com EGI foi realizada em meio tamponado e não tamponado, verificando-se que a reação em meio não tamponado foi mais rápida. Usando-se meio não tamponado foi desnecessária a etapa de dessalinização, com resina, que causa perda dos produtos de baixa massa molecular em até 50%. Além disso a resolução, em coluna de Biogel-P2, foi melhor por não haver o arraste causado pelo sal remanescente após o tratamento com resina. Sendo os resultados repetitivos, escolheu-se o meio não tamponado como sistema de hidrólise a ser empregado no nosso trabalho. A xiloglucana foi hidrolisada em meio aquoso com EGI, como justificado acima, obtendo-se uma mistura de oligossacarídeos com rendimento de 90% (fração H<sub>EGI</sub>). Paralelamente, mesma massa de xiloglucana foi hidrolisada com XG5 obtendo-se uma mistura de oligossacarídeos com rendimento de 93,6%, fração H<sub>XG5</sub>.

Os hidrolisados H<sub>EGI</sub> e H<sub>XG5</sub> foram aplicados em coluna de Biogel-P2 e eluídos com H<sub>2</sub>O. A partir de H<sub>EGI</sub> obteve-se o perfil apresentado na Figura 4A, o qual

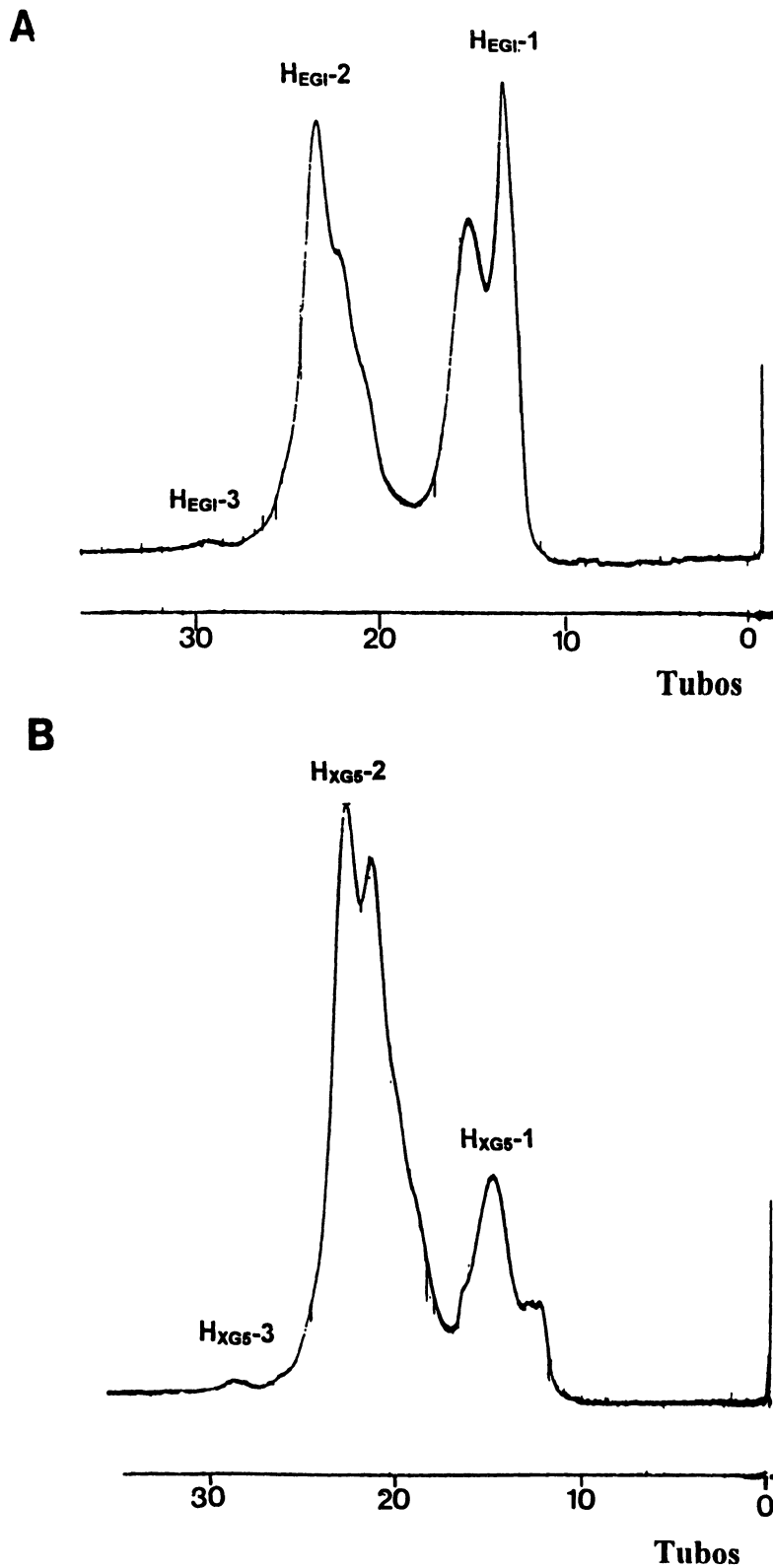


FIGURA 4 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM BIOGEL-P2, ELUÍDA COM ÁGUA A 60 ° C. (A) H<sub>EGI</sub>; (B) H<sub>XGS</sub>.

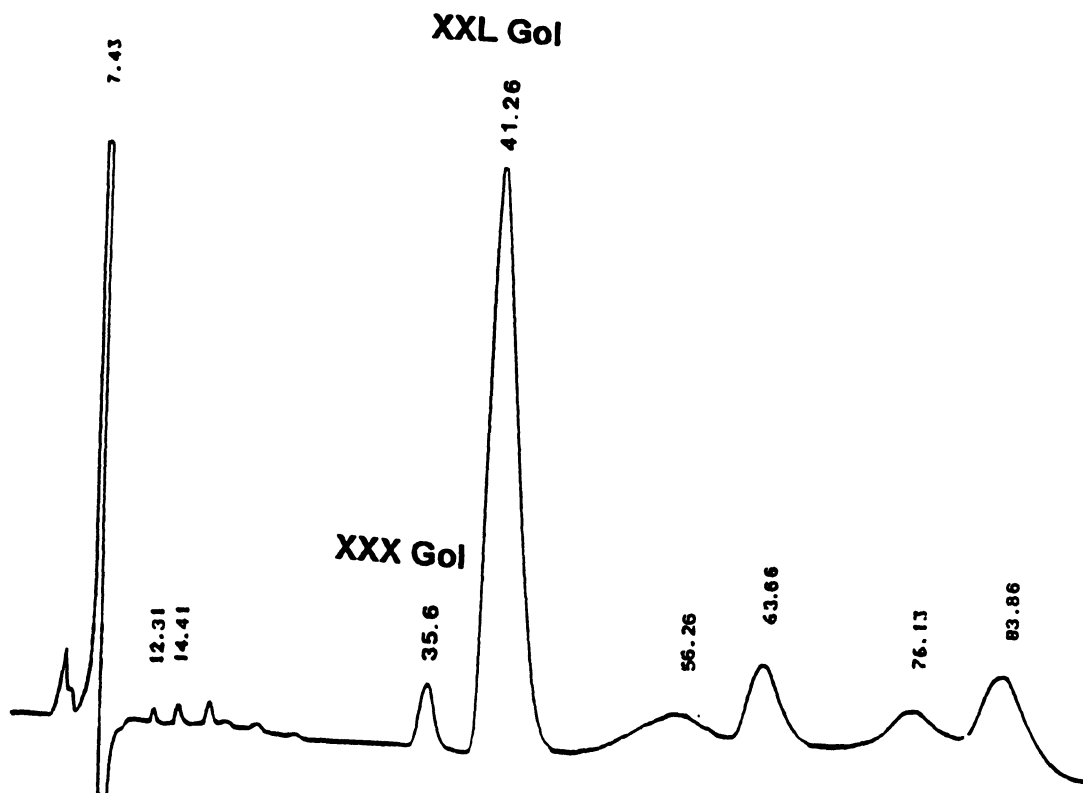


FIGURA 5 - PERFIL DE HPLC, EM COLUNA C-18, ELUÍDA COM 7% DE METANOL EM ÁGUA DA FRAÇÃO H<sub>EGI</sub>-2.

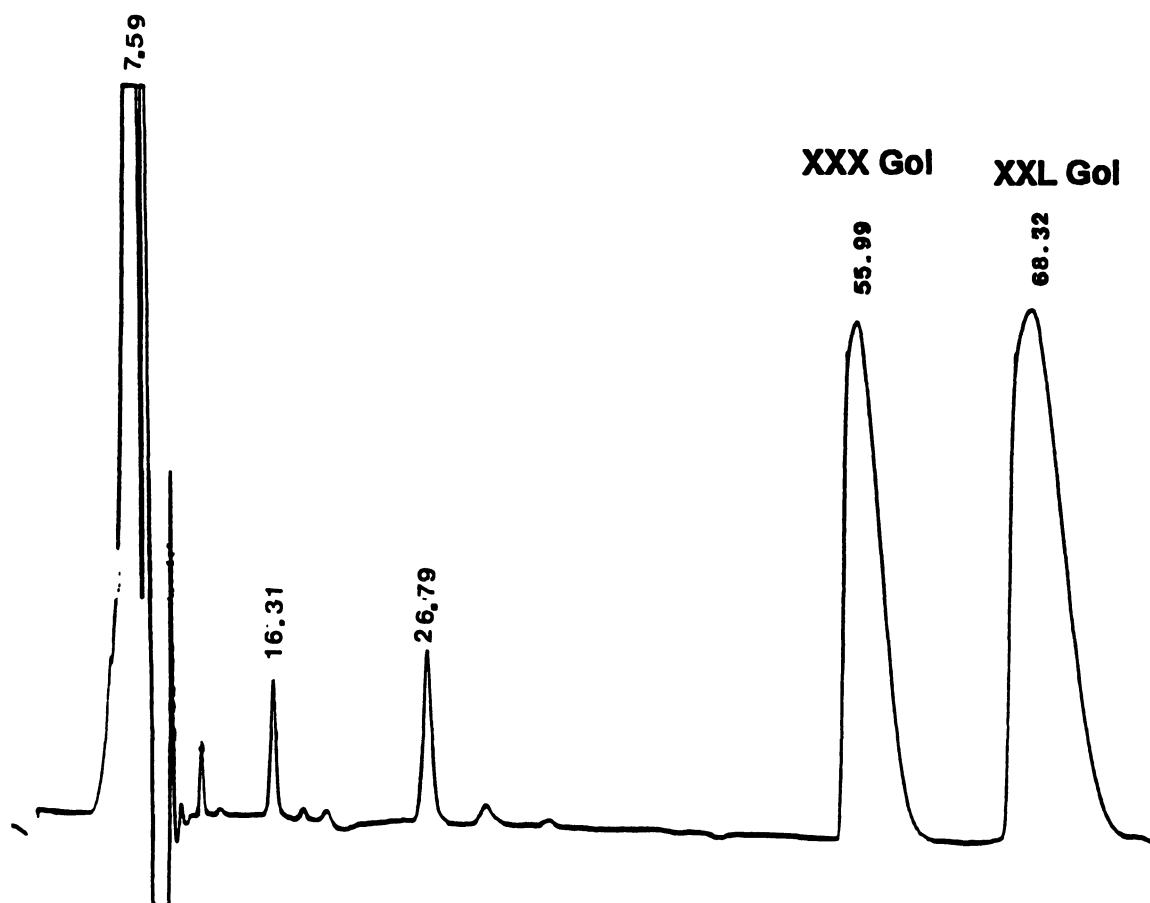


FIGURA 6 - PERFIL DE HPLC, EM COLUNA C-18, ELUÍDA COM 7% DE METANOL EM ÁGUA DA FRAÇÃO H<sub>XG5</sub>-2.

apresenta os picos H<sub>EGI-1</sub>, H<sub>EGI-2</sub> e H<sub>EGI-3</sub> (rendimento de 35,1% em relação a massa hidrolisada), verificou-se que cerca de 48% dos oligossacarídeos gerados foram de alta massa molecular (H<sub>EGI-1</sub>). Isto é explicado pela especificidade da endoglucanase do tipo I de *Humicola insolens* que reconhece como substrato os segmentos da cadeia principal de glucana que apresentam duas unidades consecutivas de glucose não substituídas, como foi demonstrado por Armand *et al.* (1997), utilizando como substrato um tetrassacarídeo bifluorescente.

A fração H<sub>XG5</sub> (obtida a partir da hidrólise enzimática com XG5) apresentou, após Biogel-P2, os picos H<sub>XG5-1</sub>, H<sub>XG5-2</sub> e H<sub>XG5-3</sub> (rendimento de 41,2% em relação a massa total hidrolisada). Este rendimento baixo apresentado tanto no hidrolisado H<sub>EGI</sub> como H<sub>XG5</sub>, poder ser atribuído a filtração das frações em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm antes da aplicação na coluna de Biogel-P2. A fração H<sub>XG5-1</sub>, fração de alta massa molecular, (Fig. 4B) representa cerca de 23% da massa de oligossacarídeos obtido com XG5. Este resultado demonstra uma diferença significativa no modo de ação das duas enzimas, visto que com XG5 obtém-se a metade da quantidade oligossacarídeos de alto massa molecular.

As frações H<sub>EGI-2</sub>, H<sub>EGI-3</sub>, H<sub>XG5-2</sub> e H<sub>XG5-3</sub> foram reduzidas com NaBH<sub>4</sub> para facilitar a separação por HPLC. As frações H<sub>EGI-2</sub> e H<sub>XG5-2</sub> reduzidas foram aplicadas em coluna C-18 semi-preparativa e eluídas com uma mistura água:metanol. O sal remanescente da redução elui logo nos primeiros minutos com tempo de retenção (Tr) de 7 min.

Foram obtidos como produtos principais, GP 7 e 8, para as duas frações de hidrolisados, porém havendo uma considerável diferença na percentagem entre os oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise com EGI e XG5.

A partir da fração H<sub>EGI-2</sub> foram obtidos os oligossacarídeos reduzidos com tempo de retenção 12, 14, 35 e 41 min (GP 5, 6, 7 e 8, rendimento de 0,9; 0,6; 4,7 e 93,8%, respectivamente). Pode-se observar que existiam ainda os picos Tr 56, 63, 76 e 83, os quais correspondem aos oligossacarídeos de GP 7, 8, 9 e 8 não reduzidos, Fig. 5.

A partir da H<sub>XG5</sub>-2 obteve-se os mesmos oligossacarídeos reduzidos GP 5, 6, 7 e 8, Tr 16, 26, 55 e 68 com cerca de 1,5; 3,0; 39,9 e 55,6%, respectivamente (Fig. 6). Pode-se verificar uma diferença nos tempos de retenção dos oligossacarídeos devido a utilização de duas colunas C-18 distintas.

O oligossacarídeo de GP 8 apresentou-se como o produto mais abundante, independente da enzima utilizada. Todos os oligossacarídeos foram analisados por FAB-MS e RMN de <sup>1</sup>H e/ou <sup>13</sup>C. Os oligoglicosil alditóis foram caracterizados por comparação de seus espectros de RMN com os espectros apresentados na literatura para os oligossacarídeos de xiloglucana de tamarindo (Hisamatsu *et al.*, 1993; York *et al.*, 1993; Guillén *et al.*, 1995; Braccini *et al.*, 1995). Apresenta-se, a seguir, a caracterização dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise com EGI.

O oligossacarídeo com tempo de retenção Tr 12 em HPLC em coluna C-18, chamado XXGol, (Fry *et al.*, 1993) foi analisado por FAB-MS positivo, sendo a massa molecular de 770 (Fig 7A), apresentando os seguintes fragmentos de íons m/z 809 (M+K)<sup>+</sup>, m/z 793 (M+Na)<sup>+</sup>, m/z 771 (M+H)<sup>+</sup> e m/z 639 (M-Xil +H)<sup>+</sup>. No espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 7B), na região de H-1 tem-se um multiplete centrado em δ 4,82, representando α-Xilp e os dupletes a δ 4,45 e 4,50 atribuídos a β-Glup. Estando os espectros de FAB-MS e RMN de acordo com os valores da literatura para XXGol (McDougall e Fry, 1991; York *et al.*, 1993; Hisamatsu *et al.*, 1993; Lorences e Fry, 1994; Guillén *et al.*, 1995).

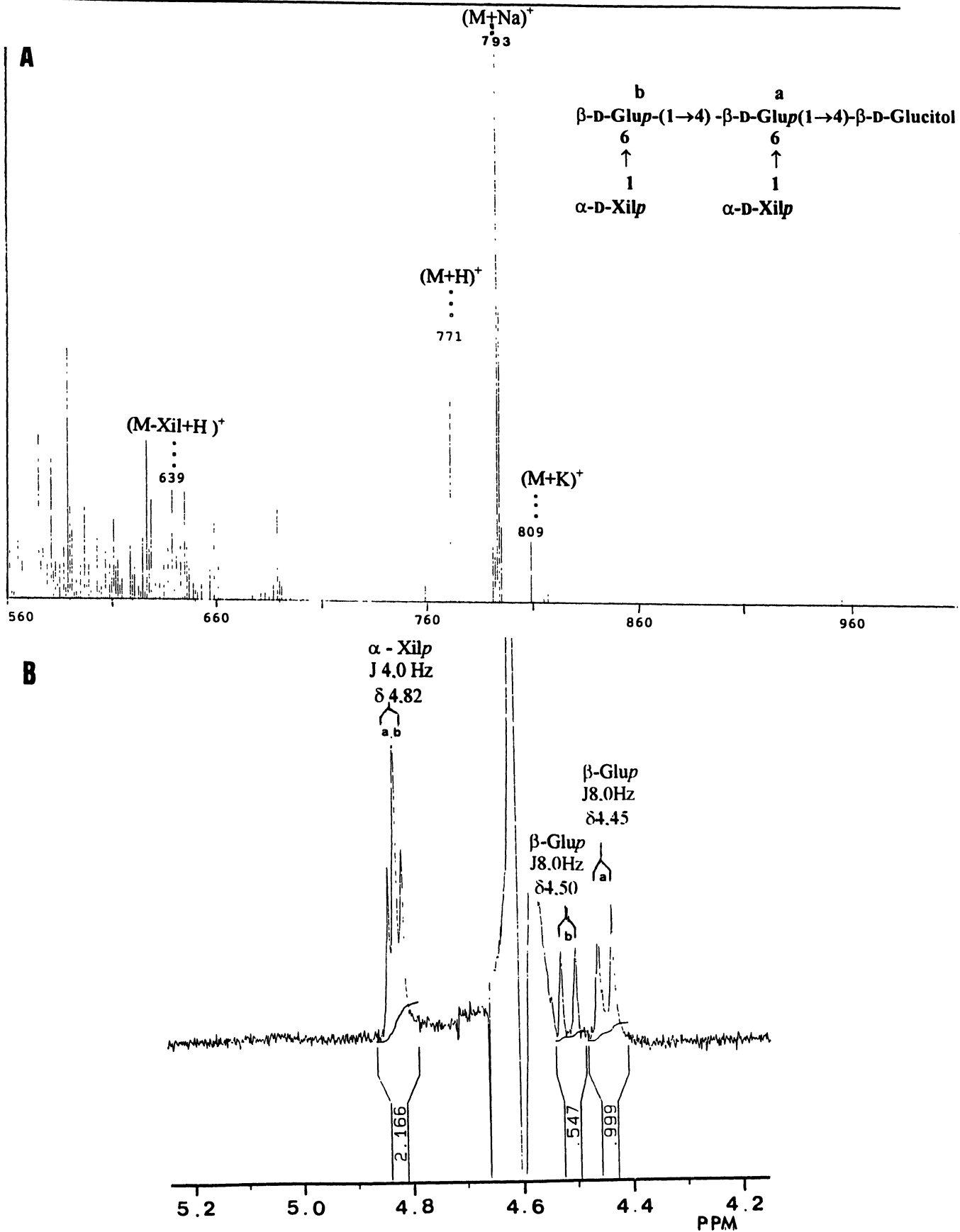


FIGURA 7 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XXGoI (TR 12) (A) DE FAB-MS POSITIVO, (B) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA (δ<sub>2,03</sub>).

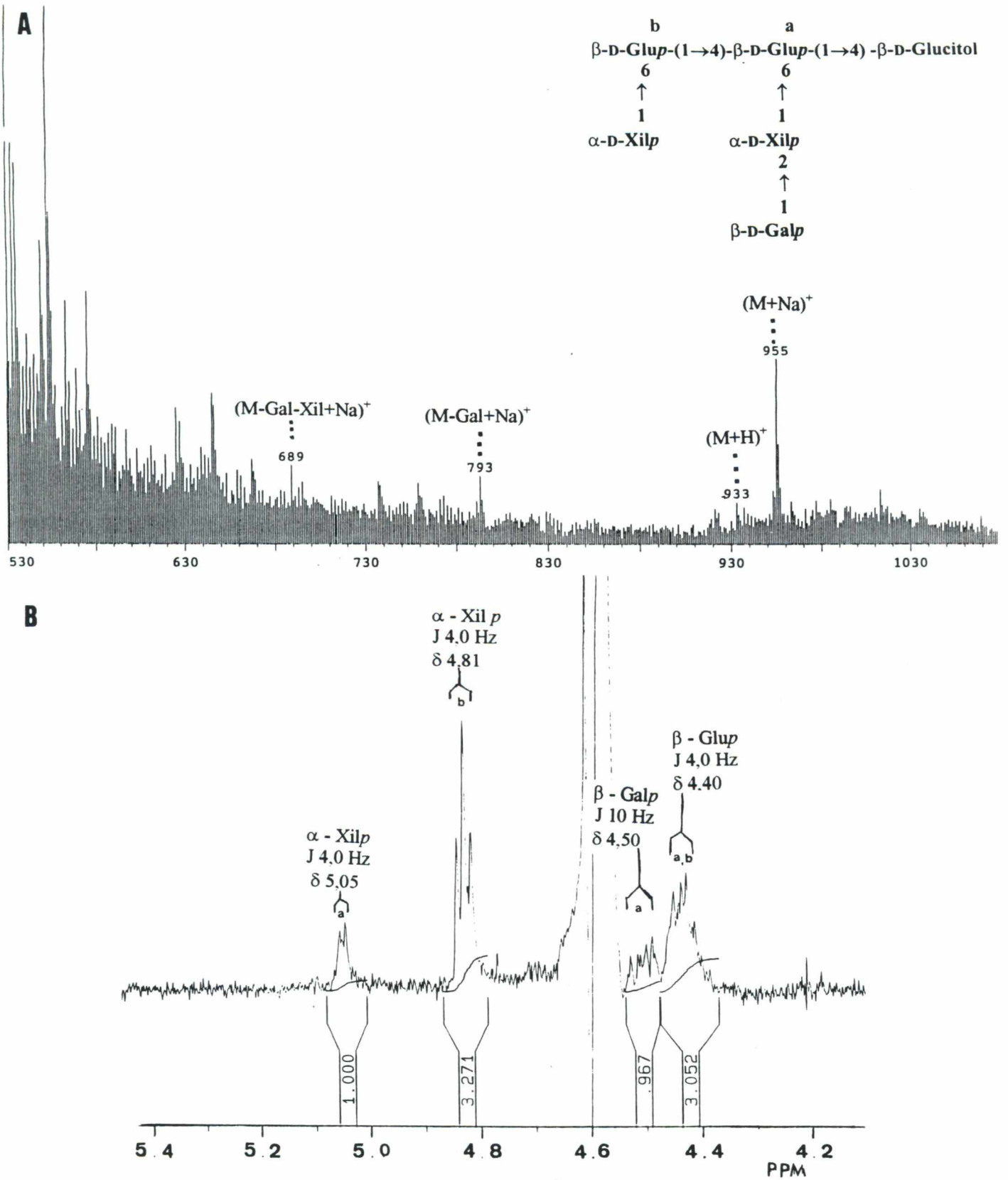


FIGURA 8 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XLGoI (TR 14) (A) DE FAB-MS POSITIVO (B) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$ 2,03).

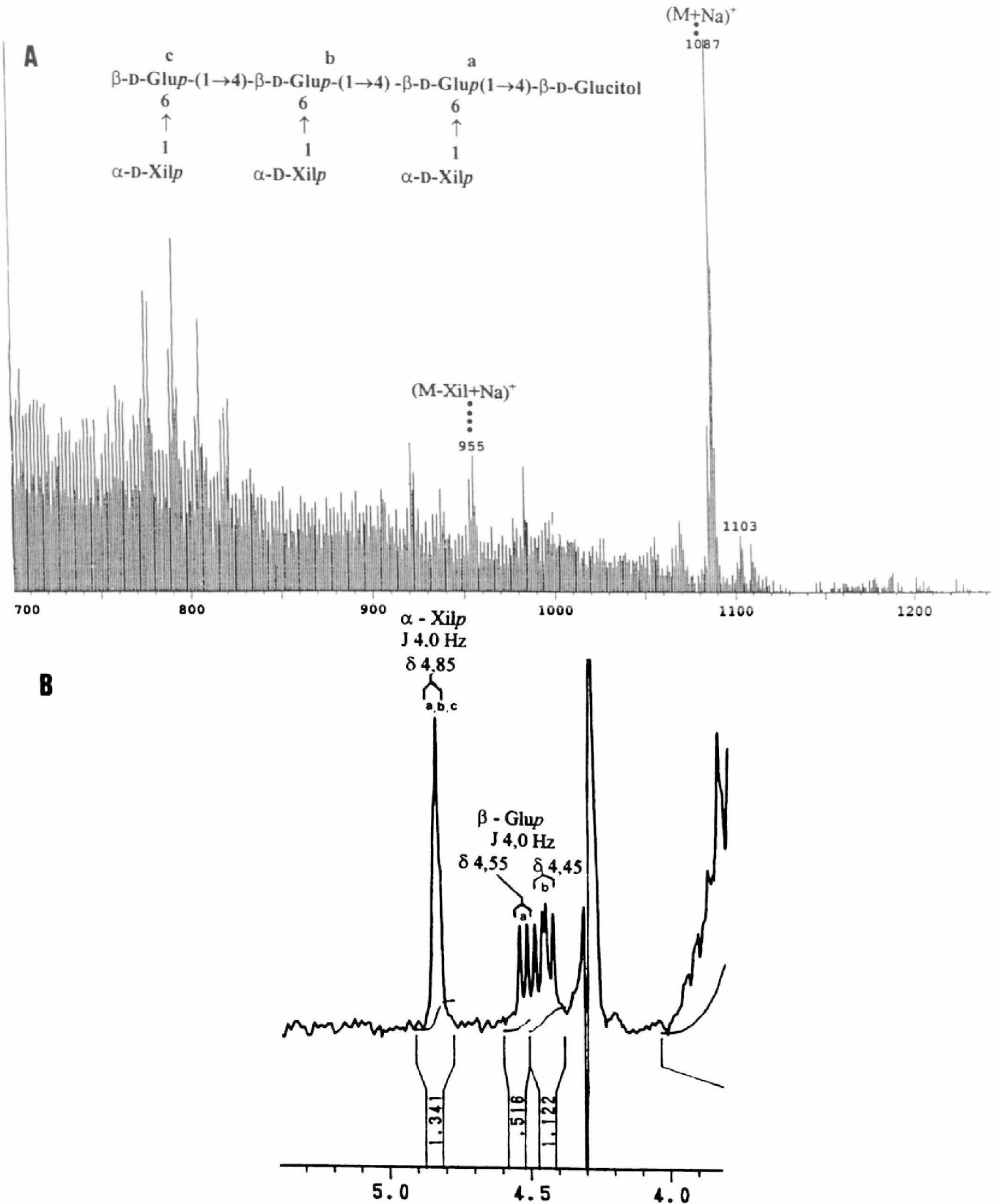


FIGURA 9 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XXXGol (TR 35) (A) DE FAB-MS POSITIVO (B) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$ 2,03).

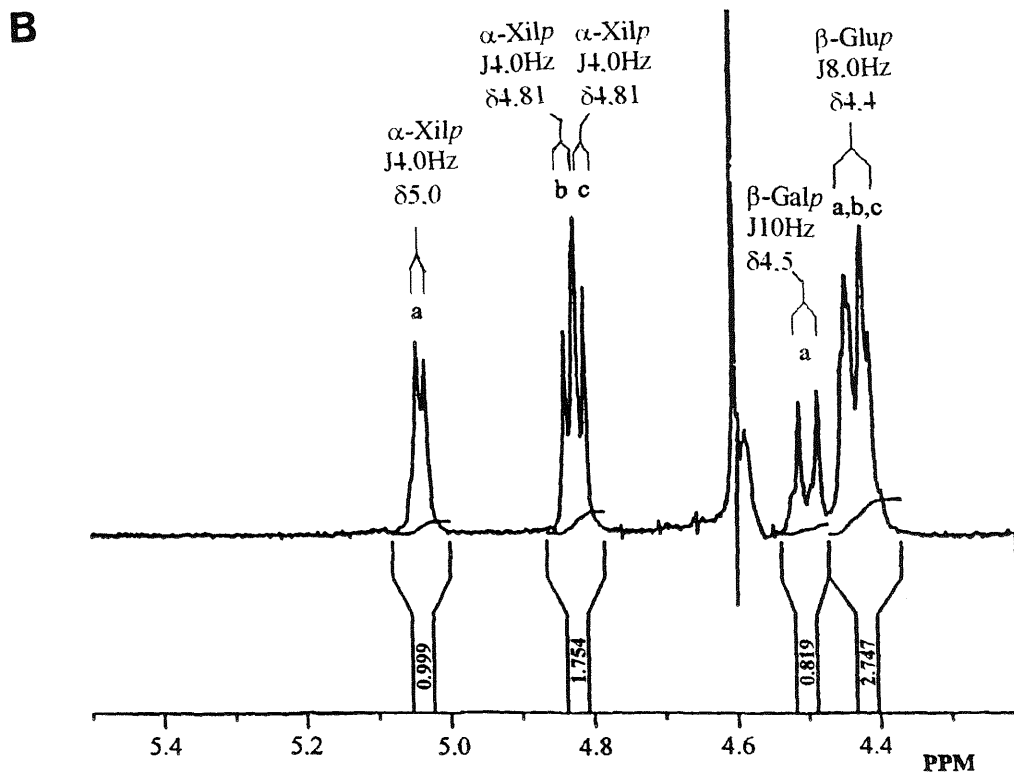
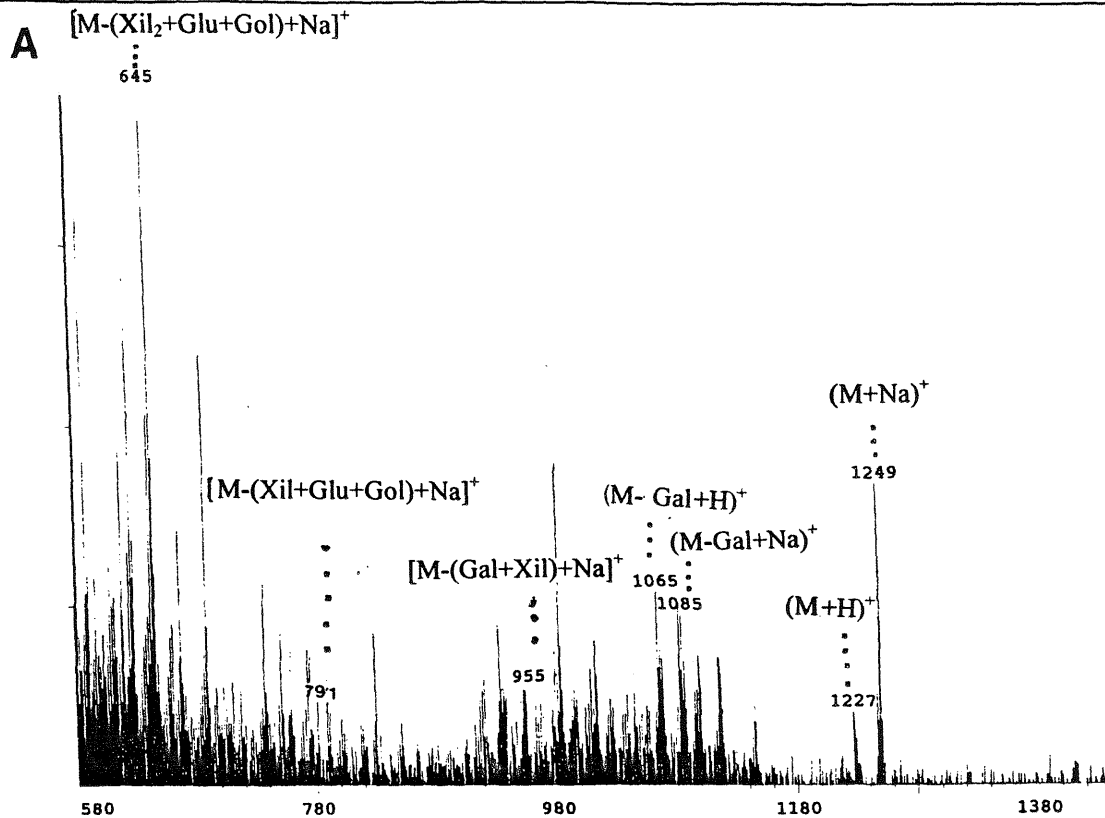


FIGURA 10 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XXLGoI (TR 41). (A) DE FAB-MS POSITIVO; (B) DE RMN- $^1H$ , EM  $D_2O$ , 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$ 2,03).

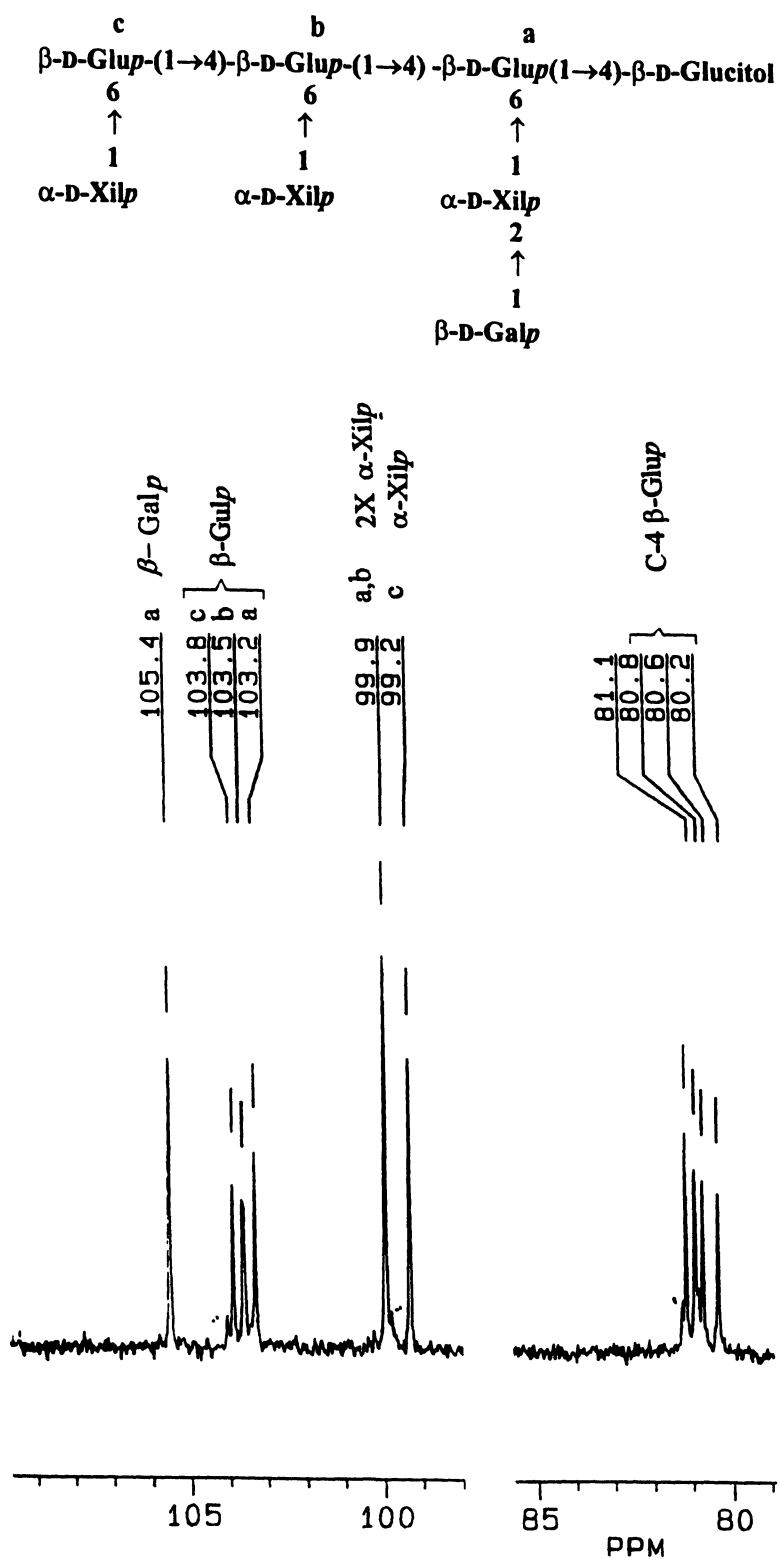


FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO OLIGOSSACARÍDEO XXLGol (TR 41), em D<sub>2</sub>O, 75 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$  29,80).

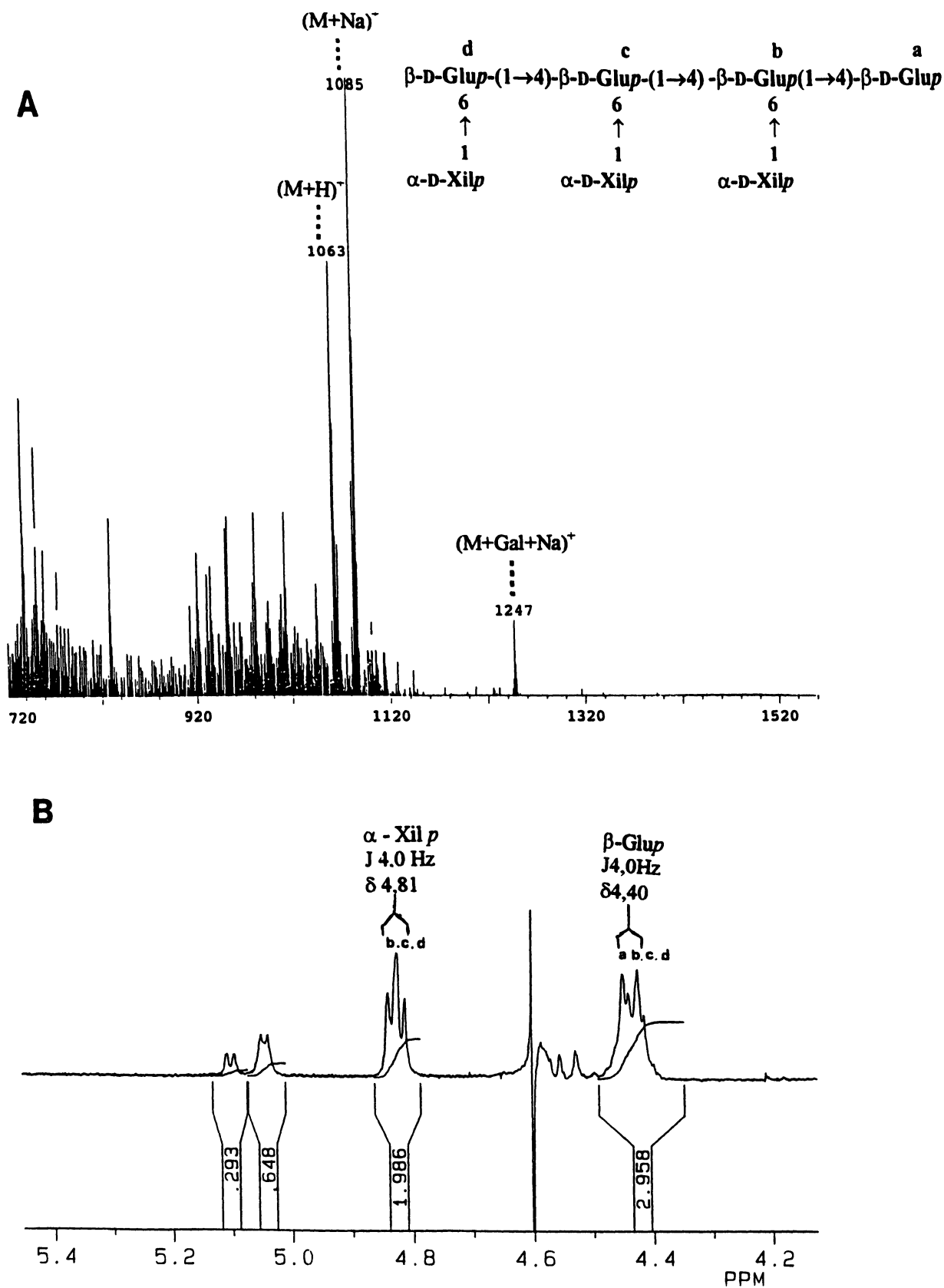


FIGURA 12 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XXXG (TR 63). (A) DE FAB-MS POSITIVO; (B) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA (δ2,03).

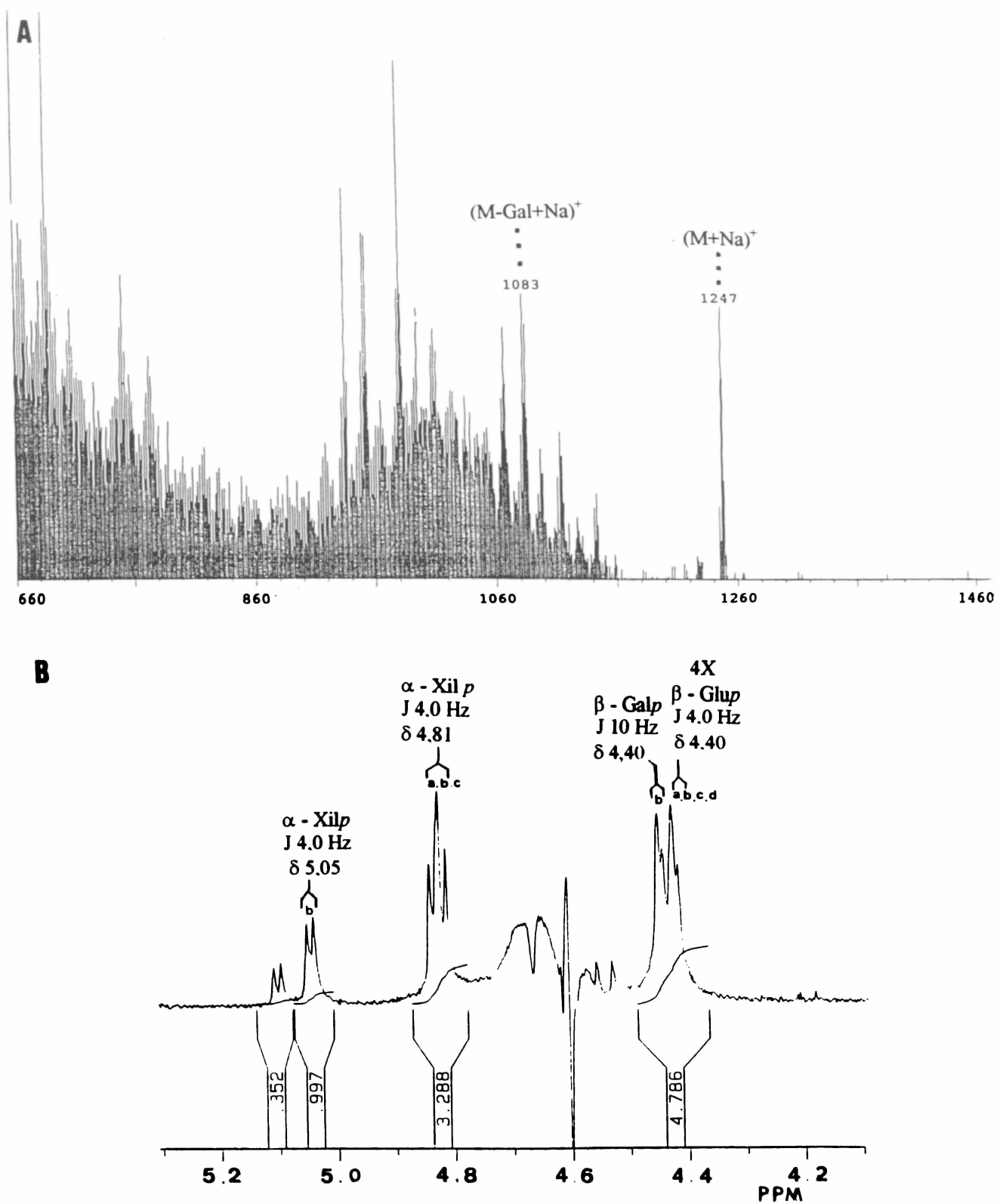


FIGURA 13 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XXLG (83). (A) DE FAB-MS POSITIVO; (B) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$ 2,03).

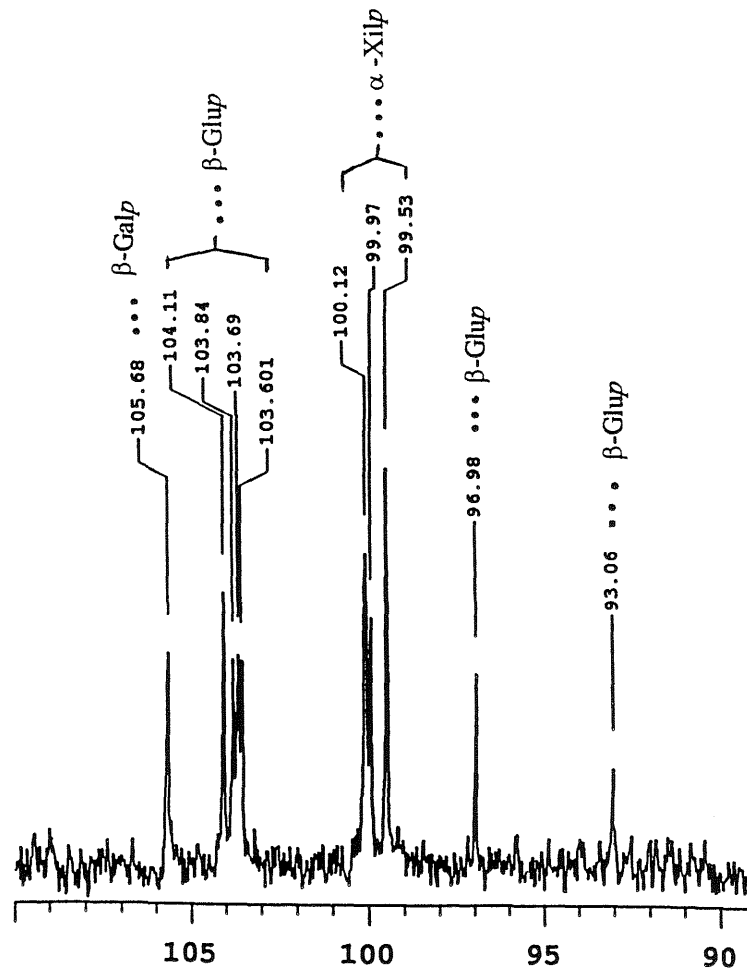
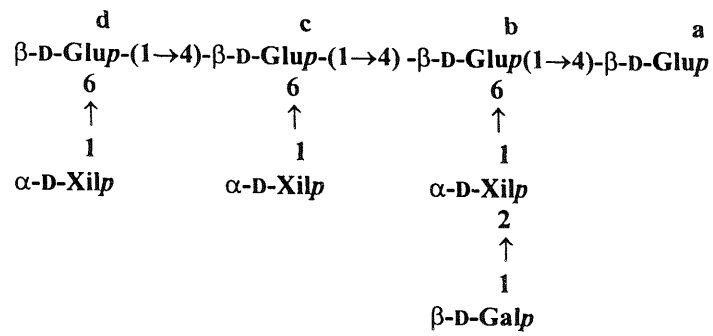


FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DO OLIGOSSACARÍDEO XXLG (83), EM D<sub>2</sub>O, 75 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA ( $\delta$  29,80).

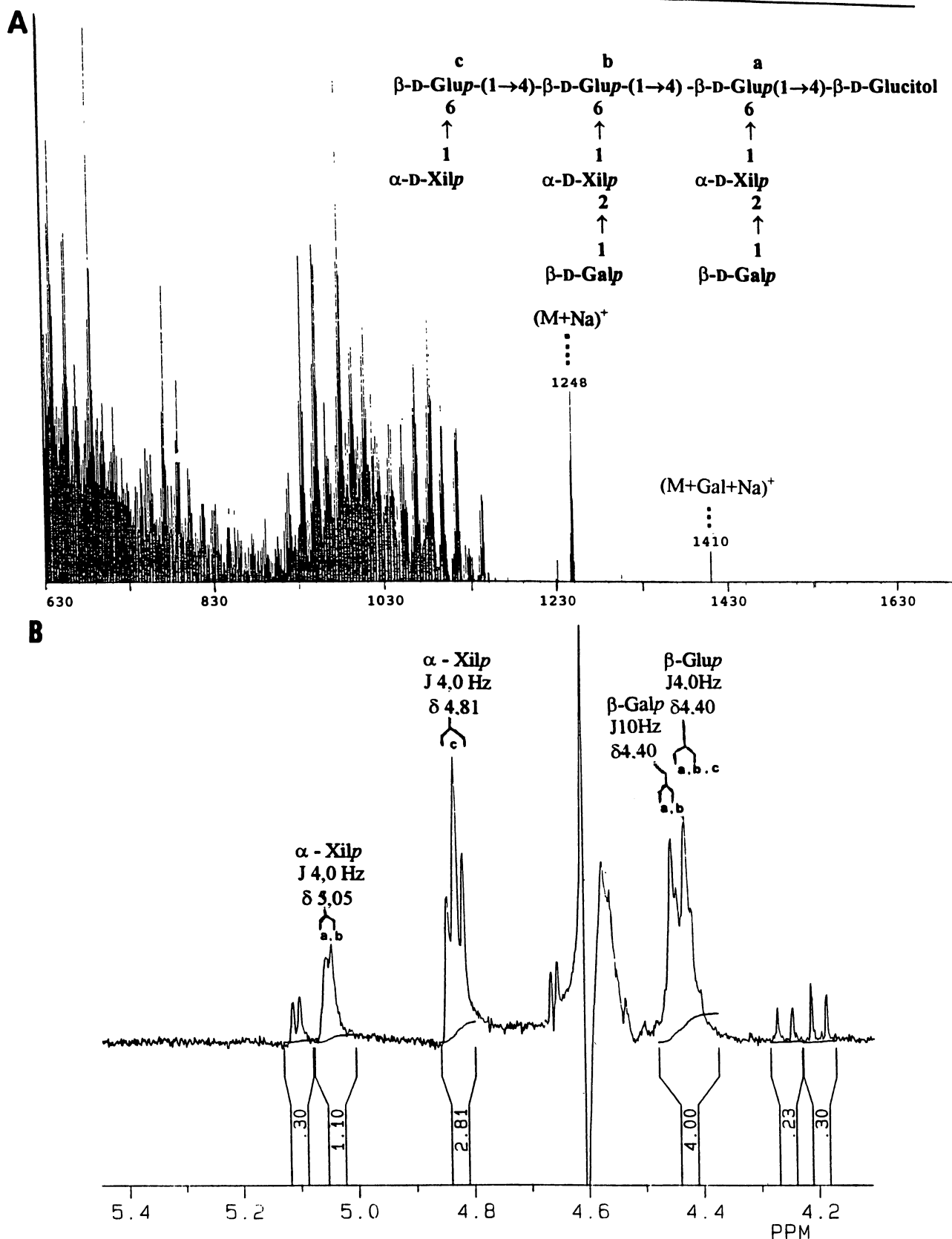


FIGURA 15 - ESPECTRO DO OLIGOSSACARÍDEO XLLGol (TR 76). (A) DE FAB-MS POSITIVO; (B) DE RMN-<sup>1</sup>H, EM D<sub>2</sub>O, 300 MHz, PADRÃO INTERNO ACETONA (δ 2,03).

As Figs. 8A e B apresentam os espectros de FAB-MS e RMN-<sup>1</sup>H do hexassacarídeo XLGol (Tr 14). Os íons de fragmentação a  $m/z$  955  $(M+Na)^+$ ,  $m/z$  933  $(M+H)^+$ ,  $m/z$  793  $(M-Gal+Na)^+$ ,  $m/z$  689  $[M-(Gal+Xil)+Na]^+$ , demonstram que a massa molecular do oligossacarídeo é de 932. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H apresenta um sinal de H-1 a  $\delta$  5,05 correspondente a unidade de  $\alpha$ -Xilp substituída em O-2 por  $\beta$ -Galp; um multiplete a  $\delta$  4,81 que indica a  $\alpha$ -Xilp não substituída,  $\beta$ -Galp ( $\delta$  4,50, J 10 Hz) e  $\beta$ -Glup ( $\delta$  4,40, J 4,0 Hz; 3 unidades). A existência de sinais a  $\delta$  4,81 que podem corresponder a 2 unidades de xilose e 3 sinais de  $\beta$ -Glup a  $\delta$  4,40 pode ser atribuído a contaminação do hexassacarídeo XLGol pelo GXXGol, o que é consistente com os fragmentos encontrados no espectro de FAB-MS, bem como a especificidade da enzima conforme discutido anteriormente. O oligossacarídeo GXXGol já foi identificado por Guillén *et al.* (1995), que demonstrou que o tempo de retenção apresentado para estes 2 oligossacarídeos, em coluna Sprerisob ODS1, eluída com 10% de metanol é de  $\delta$  4,40 e  $\delta$  4,80 para XLGol e GXXGol, respectivamente.

O oligossacarídeo de Tr 35, XXXGol, apresentou, de acordo com seu espectro de FAB-MS (Fig. 9A), massa molecular de 1064. Apresentou os fragmentos de  $m/z$  de 1087  $(M + Na)^+$  e  $m/z$  955  $(M - Xil + Na)^+$ . A região de H-1, do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 9B), apresentou um sinal  $\delta$  4,85 correspondente a  $\alpha$ -Xilp (J 4,0 Hz, 3 unidades), os dupletes a  $\delta$  4,55 (J 4,0 Hz, 1 unidade) e  $\delta$  4,45 (J 4,0 Hz, 2 unidades) são atribuídos a  $\beta$ -Glup. A ausência do sinal a  $\delta$  5,05 correspondente a  $\alpha$ -Xilp substituída em O-2 por  $\beta$ -Galp, reforça a estrutura estabelecida para este oligossacarídeo.

O oligossacarídeo principal, XXLGol (Tr = 41), apresenta uma massa molecular de 1226 determinada por FAB-MS (Fig. 10A), com sinais de fragmentação a  $m/z$  1249  $(M+Na)^+$ ,  $m/z$  1227  $(M+H)^+$ ,  $m/z$  1085  $(M-Gal+Na)^+$ ,  $m/z$  1065  $(M-Gal+H)^+$ ,

$m/z$  955  $[M-(Gal+Xil)+Na]^+$ ,  $m/z$  791  $[M-(Xil+Glu+Gol)+Na]^+$  e  $m/z$  645  $[M-(Xil_2+Glu+Gol)+Na]^+$ .

O espectro de RMN- $^1H$  de XXLGol (Fig. 10B), apresentou os sinais de H-1 das unidades de  $\alpha$ -Xilp como um duplete ( $\delta$  5,03, J 4,0 Hz) e um triplete de 2 sinais superpostos centrados a  $\delta$  4,81, cada um com J 4,0 Hz. Os sinais de  $\beta$ -Galp foram detectados como um duplete ( $\delta$  4,50; J 10,0 Hz). O sinal H-1 de  $\beta$ -Glu p apresentou-se como um conjunto de dupletes ( $\delta$  4,40; J 8,0 Hz; 3 unidades).

O espectro de RMN- $^{13}C$  de XXLGol (Fig. 11) foi consistente com a estrutura apresentada na literatura (York *et al.*, 1993; Guillén *et al.*, 1995), com sinais de C-1 a  $\delta$  105,4 para  $\beta$ -D-Galp;  $\delta$  103,8,  $\delta$  103,5 e  $\delta$  103,2 para as unidades de  $\beta$ -D-Glu p;  $\delta$  99,9 ( $\alpha$ -D-Xilp, 2 unidades) e  $\delta$  99,2 para a unidade de  $\alpha$ -D-Xilp substituída por  $\beta$ -D-Galp em O-2.

A fração isolada a Tr 56 apresentou, em seu espectro de FAB-MS, como fragmento principal o sinal de  $m/z$  1085  $(M+Na)^+$  e  $m/z$  1063  $(M+H)^+$ , correspondente ao heptassacarídeo XXXG, de massa molecular de 1062. Porém, seu espectro de RMN- $^1H$  e  $^{13}C$  não foram obtidos devido a pequena quantidade isolada.

O espectro de FAB-MS (Fig. 12A) do pico isolado com Tr 63, apresentou como fragmento mais abundante o sinal de  $m/z$  1085  $(M+Na)^+$  e  $m/z$  1063  $(M+H)^+$ , correspondente ao heptassacarídeo XXXG, de massa molecular de 1062. Porém pode-se verificar a presença de um sinal a  $m/z$  1247  $(M+Gal+Na)^+$ , o qual é atribuído ao octassacarídeo não reduzido XXLG. O espectro de RMN- $^1H$  (Fig. 12B) apresentou na região de H-1 o sinal a  $\delta$  4,81 de  $\alpha$ -Xilp (J 4,0 Hz, 3 unidades) e a  $\delta$  4,40 correspondente a  $\beta$ -Glu p (J 4,0 Hz, 4 unidades). Pode-se ainda verificar um deslocamento do sinal de  $\alpha$ -Xilp substituída em O-2 por  $\beta$ -Galp a  $\delta$  5,05 e um sinal de  $\beta$ -Galp a  $\delta$  4,55, o que confirma a presença de XXXG e XXLG nesta fração.

Isolou-se o octassacarídeo XXLG, Tr 83, que foi caracterizado por FAB-MS e RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. (Fig. 13A, B e 14, respectivamente). O espectro de RMN-<sup>1</sup>H apresenta sinais da região de H-1 a  $\delta$  5,05 correspondente  $\alpha$ -Xilp substituída em O-2 por Galp e um triplete de 2 sinais centrados a  $\delta$  4,81, J 4,0 Hz. O sinal de H-1 de  $\beta$ -Galp foi detectado a  $\delta$  4,40 (J 10,0 Hz), superposto aos sinais de H-1 de  $\beta$ -Glup (J 4,0 Hz, 4 unidades). O espectro de RMN-<sup>13</sup>C apresentou na região de C-1 o sinal de  $\beta$ -Galp a 105,68; os sinais de  $\beta$ -Glup a 104,11; 103,84; 103,70 e 103,60. Os sinais a  $\delta$  100,12; 99,97; 99,53 são atribuídos a  $\alpha$ -Xilp. Os sinais encontrados a  $\delta$  96,98 e 93,06 são C-1 de  $\beta$ -Glup e  $\alpha$ -Glup no terminal redutor. De acordo com o espectro de FAB-MS determinou-se a massa molecular 1224 para o oligossacarídeo, com os fragmentos de m/z 1247 (M+Na)<sup>+</sup>, 1085 (M-Gal+Na)<sup>+</sup> e 953 [M-(Xil+Gal)+Na]<sup>+</sup>.

O nonassacarídeo XLLGol (Tr 76) foi isolado e caracterizado, por FAB-MS (Fig. 15A), sendo sua massa molecular de 1388, com fragmento de íon a m/z 1410 (M+Na)<sup>+</sup>, tendo possivelmente contaminação por XXLG devido a abundância do sinal a m/z 1248. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Fig. 15B) apresentou a sinal de H-1 de  $\alpha$ -Xilp a  $\delta$  4,81, J 4,0 Hz e a  $\delta$  5,05 o sinal de  $\alpha$ -Xilp (J 4,0 Hz) substituído em O-2 por  $\beta$ -Galp. Os sinais de  $\beta$ -Glup e  $\beta$ -Galp apresentam-se sobrepostos a  $\delta$  4,40 (J 4,0 e 10 Hz, respectivamente).

Na Fig. 6 pode-se verificar que ao realizar-se a hidrólise da xiloglucana com XG5 obtém-se os mesmos oligossacarídeos isolados a partir da hidrólise com EGI, porém em quantidades relativas diferentes entre eles. A percentagem de XXXGol e XLLGol foram de 39,9 e 55,6%, respectivamente com XG5. Sendo que na hidrólise com EGI, tinha-se como produto principal quase exclusivamente XLLGol (93,8 %). As estruturas de XXXGol e XLLGol obtidas a partir da hidrólise com XG5 foram confirmadas por FAB-MS e espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H. Estes resultados apoiarão o estudo da seqüência de blocos no polissacarídeo original.

### 3-ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANA

Os oligossacarídeos de xiloglucana (XXLGoI, XXXGoI e XXGoI) isolados e caracterizados conforme descrito anteriormente, foram utilizados para os ensaios biológicos. Outros oligossacarídeos derivados ou não de xiloglucana, foram usados paralelamente como parâmetro de comparação.

Oligossacarídeos preparados da xiloglucana pertencem a uma classe de moléculas sinalizadoras, chamadas oligossacarinas (Introdução, pg. 16). Estas moléculas de açúcares induzem respostas de defesa em plantas e/ou exibem efeito de crescimento ou desenvolvimento (Aldington e Fry, 1993). Características fisiológicas ou respostas bioquímicas iniciadas por oligossacarídeos de xiloglucana, em concentração nanomolar ou micromolar, estão associadas a elementos estruturais específicos. Assim a atividade biológica dos oligossacarídeos foi avaliada com relação ao crescimento de coleóptilos e indução de hidrolases.

#### 3.1-TESTE DE CRESCIMENTO DE COLEÓPTILOS

A atividade antiauxínica dos oligossacarídeos de xiloglucana tem sido amplamente estudadas, *in vivo*, utilizando-se caules de ervilha e cenoura (Iino, 1996). Escolheu-se como modelo os coleóptilos de trigo pelo fácil manuseio e por tratar-se de um sistema em gramínea ainda não utilizado (McDougall e Fry, 1989; Augur *et al.*, 1992).

Os coleóptilos incubados em diferentes placas de Petri não mostraram variabilidade considerável de alongação. Portanto, todas as amostras submetidas ao mesmo indutor foram tratadas como uma população simples, apesar de estarem distribuídas em

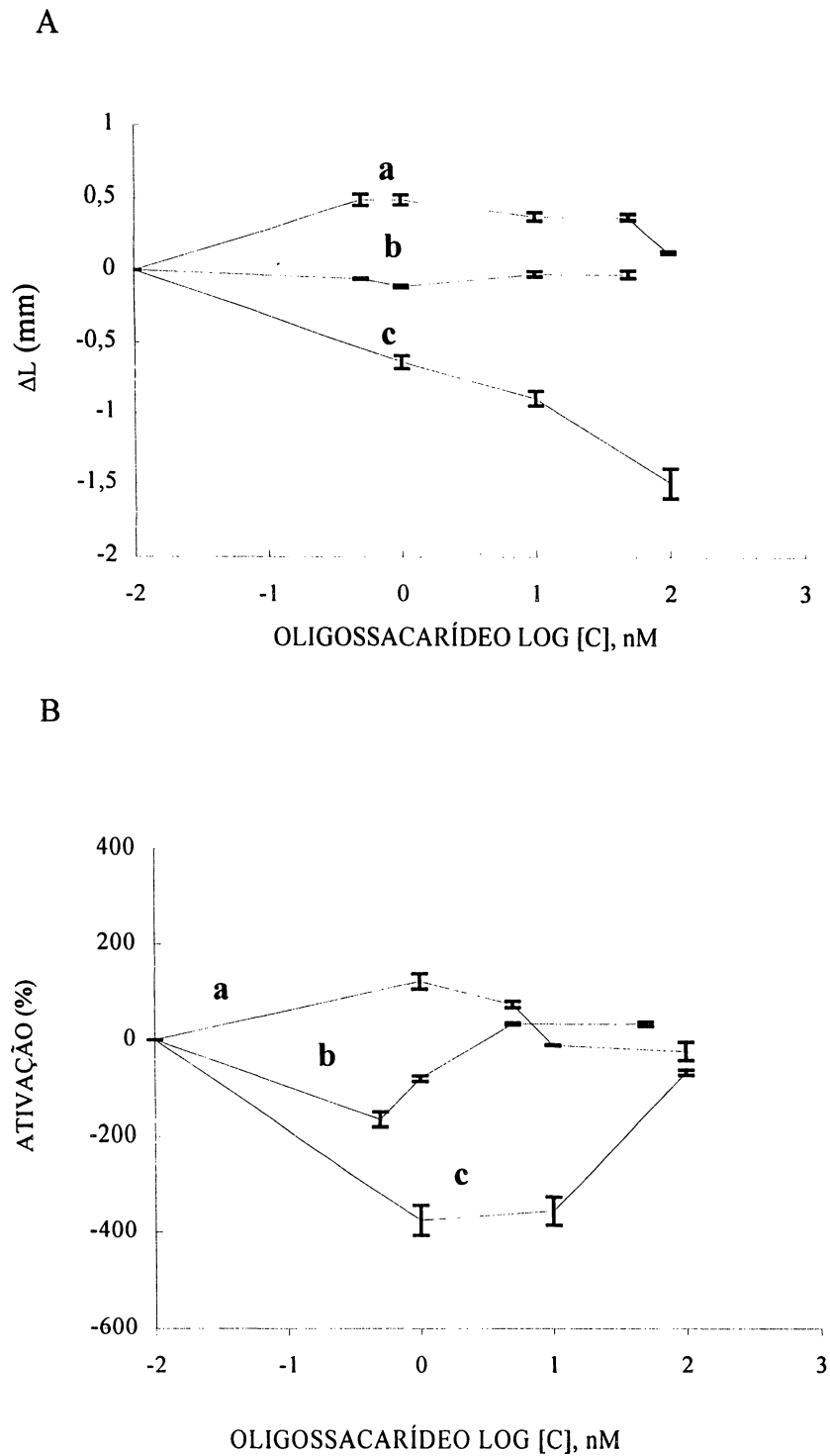


FIGURA 16 - EFEITO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DERIVADOS DA XILOGLUCANA a (XXLGoI); b (XXFGol) e c ( Fucosil-lactose) SOBRE: (A) O CRESCIMENTO DE COLEÓPTILOS DE TRIGO EM MEIO SEM 2,4-D; (B) EM MEIO COM 2,4D. COMPRIMENTO INICIAL = 3,87 mm,  $\Delta L$ = ACRÉSCIMO DE COMPRIMENTO DEVIDO AOS OLIGOSSACARÍDEOS.

placas distintas. Foi testada a capacidade dos oligossacarídeos de xiloglucana XXLGol e XXFGol e da fucosil-lactose de interferir no crescimento dos coleóptilos, induzido ou não por 2,4-D. Os oligossacarídeos foram usados em concentrações abaixo de 100 nM, nas quais podem promover ativação da resposta enzimática. Inicialmente foi analisada a taxa de crescimento em função do tempo do experimento, a fim de estabelecer-se o período em que o crescimento foi linear para todas as amostras, estabelecendo-se tempo entre 10 e 20h para os cálculos posteriores.

A variação de crescimento ( $\Delta L$ ) foi expressa em função do logaritmo na base 10 da concentração de cada oligossacarídeo (Fig. 16A) sem 2,4-D. Os resultados indicam que XXLGol, a uma concentração entre 0,5 a 100 nM exibiu estimulação de crescimento (curva a), o XXFGol não foi ativo (curva b) e a fucosil-lactose (curva c) mostrou um efeito inibitório. O trissacarídeo (fucosil-lactose) por não conter xilose foi usado para mostrar a importância deste monossacarídeo nas respostas. XXLGol mostrou promover, na concentração nanomolar, crescimento em coleóptilos de trigo independente da presença de 2,4-D, como descrito anteriormente em concentração micromolar de oligossacarídeos de xiloglucana em testes com segmentos de ervilha (McDougall e Fry, 1990).

Na presença de 2,4-D (1  $\mu$ M; Fig. 16B), o XXLGol aumentou a resposta induzida pela auxina (curva a), porém XXFGol (curva b) e a fucosil-lactose (curva c), mostraram atividade antiauxínica. Foi observado que XXFGol é menos ativo que a fucosil-lactose tendo atividade antiauxínica a baixas concentrações, mas exibem atividade auxínica a altas concentrações. Os dados obtidos para coleóptilos de trigo confirmam que a atividade antiauxínica depende da presença da cadeia lateral  $\alpha$ -L-fucopiranosil- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-D-galactopiranosil- $\beta$ -(1 $\rightarrow$  da xiloglucana.

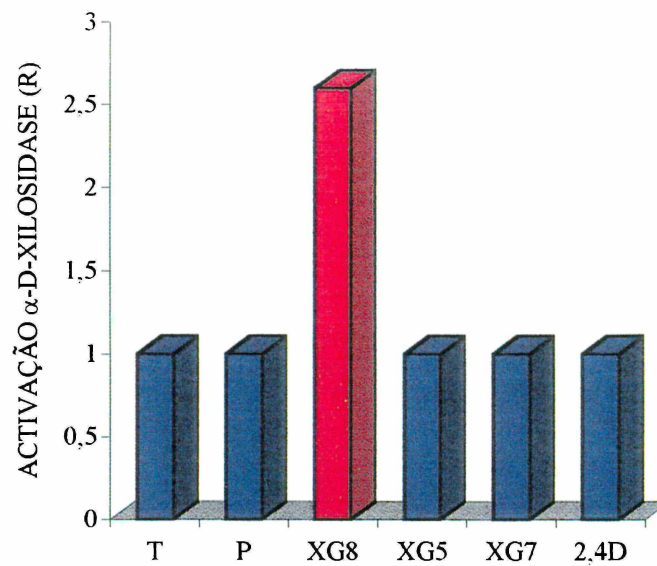
Os aspectos estruturais necessários para que XXFG exiba um efeito antiauxínico tem sido bastante estudados (York *et al.*, 1984; McDougall e Fry, 1988, 1989 a, 1989 b, 1990), tendo sua atividade ótima na faixa de nanomolar. Augur *et al.* (1992), verificaram que XXFG é tão efetivo quanto a sua forma reduzida XXFGol, e que o efeito antiauxínico é obtido somente em oligossacarídeos com a unidade de  $\alpha$ -L-fucopirranose. Tem sido também proposto que a atividade de XXFG seja resultante de 2 efeitos opostos: baixa concentração, efeito antiauxínico fucose-dependente predominante; alta concentração, efeito fucose-independente, promotor de crescimento.

Esses resultados sugerem a presença de um sistema de reconhecimento específico para os oligossacarídeos de xiloglucana em plantas. A resposta encontrada para XLLG, XXXG e XXFG em segmentos de caule de ervilha, em ausência de 2,4-D, difere em vários aspectos do efeito de inibidor de crescimento explicados acima. No caso de XXFGol a concentração ótima para promoção de crescimento é na faixa de micromolar, a unidade de fucose não é requerida e a cadeia principal de  $\beta$ -D-Glup ligada (1 $\rightarrow$ 4), substituída em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-Xilp é necessária. Estas informações estão de acordo com a hipótese de Fry *et al.* (1993), de que estes oligossacarídeos podem agir como substratos para XET.

### 3.2-INDUÇÃO DAS ATIVIDADES HIDROLASES EM PROTOPLASTOS E CÉLULAS DE *Rubus fruticosus*

Inicialmente realizou-se a triagem das atividades hidrolases induzidas nas misturas de proteínas extraídas de protoplastos (ou células) de *R. fruticosus* ( $2 \times 10^6$ ; viabilidade de 90 e 95%, respectivamente) que foram incubados durante 30 min, em presença dos oligossacarídeos XXGol, XXXGol, XXLGol a 50 nM, xiloglucana (50 nM em relação a massa molecular de XXLG) e 2,4-D (500 nM). Após cada período de

A



B

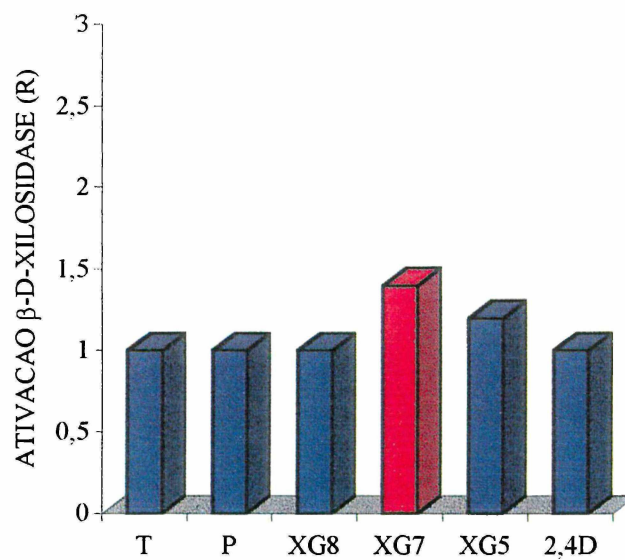
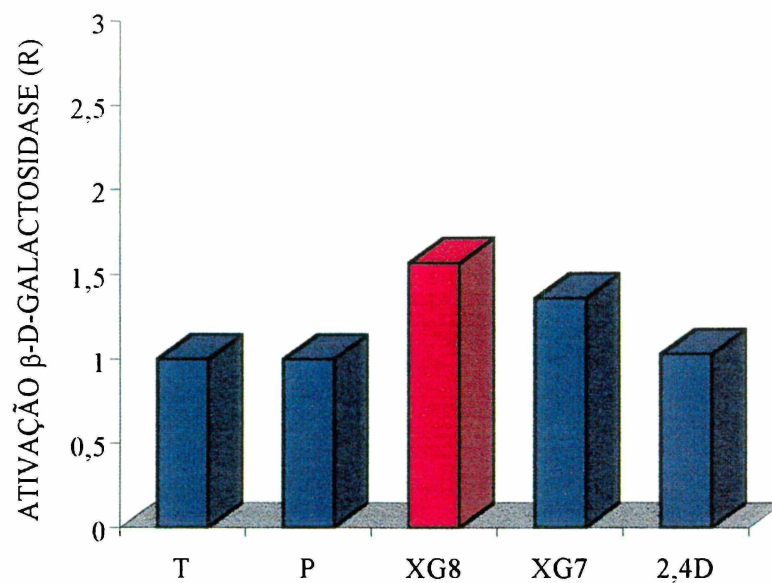


FIGURA 17 - EFEITO DO GP SOBRE A ATIVAÇÃO  $\alpha$ -D-XILOSIDASE (A) E  $\beta$ -D-XILOSIDASE (B) COM OS SEGUINTE INDUTORES: XILOGLUCANA (P), XXLGoI (XG8), XXXGoI (XG7), XXGoI (XG5) A 50 nM, 2,4D (500 nM) E CONTROLE (T); 30 MIN.

A



B

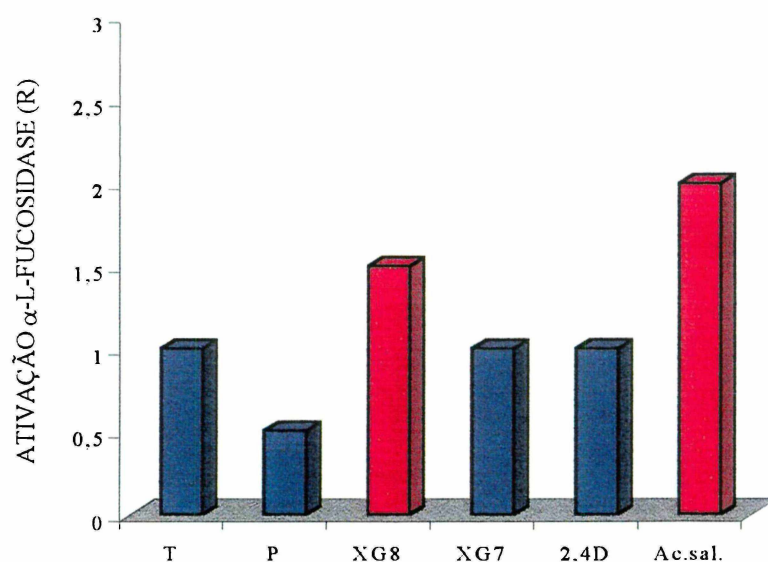
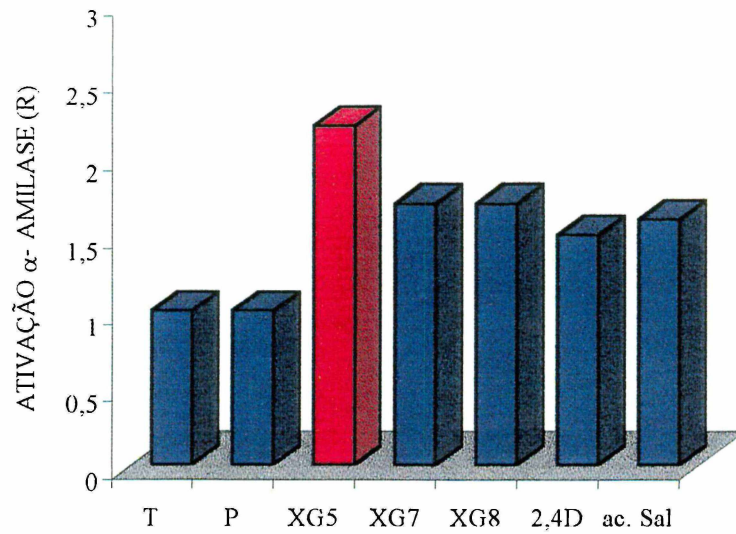


FIGURA 18 - EFEITO DO GP NA ATIVAÇÃO DA  $\beta$ -D-GALACTOSIDASE E  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE PELOS INDUTORES: XILOGLUCANA (P), XXLGoI (XG8), XXXGoI (XG7) A 50 nM E 2,4D (500 nM), POR 30 MIN E ÁCIDO SALICÍLICO (Ac.sal.; 50 nM) PARA INDUÇÃO  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE.

A



B

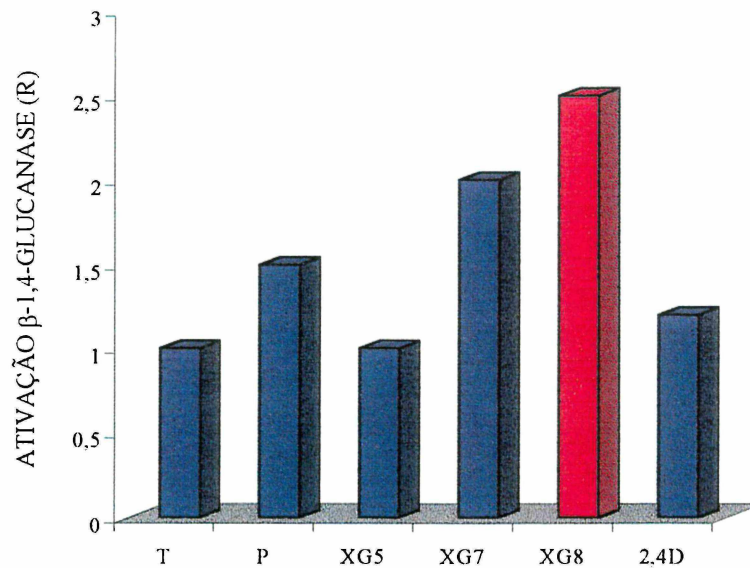


FIGURA 19 - EFEITO DO GP PARA ATIVAÇÃO (A)  $\alpha$ -AMILASE; (B)  $\beta$ -1,4-GLUCANASE INDUTORES: XILOGLUCANA (P), XXLGol (XG8), XXXGol (XG7), XXGol (XG5), a 50 nM e 2,4D (500 nM), POR 30 MIN E ÁCIDO SALICÍLICO (ac. Sal; 50 nM) PARA ATIVAÇÃO  $\alpha$ -AMILASE.

indução, as proteínas foram extraídas e quantificadas como descrito em Materiais e Métodos (pg. 50), a quantidade total de proteína extraída variou entre 60 e 80  $\mu\text{g}$ . A seguir foram medidas as atividades  $\alpha$ -L-fucosidase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -D-xilosidase,  $\beta$ -D-galactosidase, (1,4)- $\beta$ -D-glucanase, laminarinase, quitinase, galacturonase e  $\alpha$ -amilase, nesta mistura protéica. Os resultados foram analisados em função do efeito do GP sobre a ativação expressa em R para cada uma das atividades. A atividade  $\beta$ -D-xilosidase (Fig. 17B) mostra-se muito fracamente induzida por XXXGol ( $R_{\text{max}}=1,4$ ), nas condições do experimento. O oligossacarídeo XXLGol mostrou indução  $\alpha$ -D-xilosidase (Fig. 17A;  $R_{\text{max}}=2,6$ ), sendo que XXGol, XXXGol, a xiloglucana (P) e 2,4-D foram inativos.

As atividades  $\beta$ -D-galactosidase e  $\alpha$ -L-fucosidase (Fig 18A e B, respectivamente) foram levemente induzidas por XXLGol, R de 1,5 e 1,9; respectivamente. A  $\alpha$ -L-fucosidase teve como principal indutor o ácido salicílico ( $R_{\text{max}} = 2$ ). O XXXGol foi completamente inativo.

A atividade  $\beta$ -D-glucanase (Fig. 19B) tem como principais indutores o XXLGol, XXXGol e xiloglucana com R de 2,5, 2 e 1,5 respectivamente. Através da ação de  $\beta$ -D-glucanase tem-se a produção de oligossacarídeos de xiloglucana que podem controlar as atividades de crescimento celular.

A atividade  $\alpha$ -amilase (Fig. 19A) foi testada utilizando um substrato bifluorescente obtendo-se como principal indutor o XXGol ( $R_{\text{max}} = 2$ ). Os indutores, nas condições dos experimentos, não mostraram indução para galacturonase, quitinase, laminarinase.

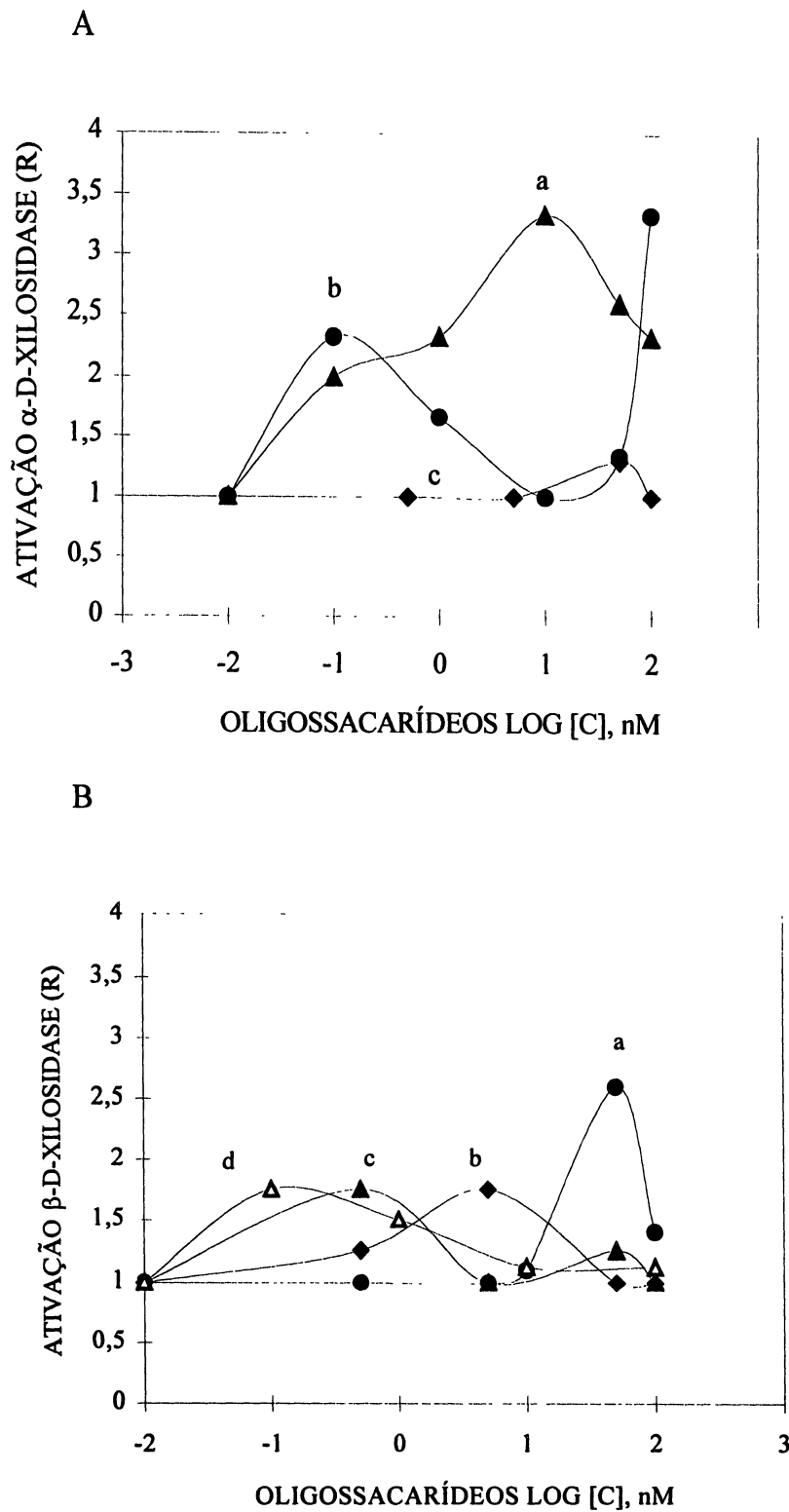


FIGURA 20- CURVA DE DOSE DEPENDÊNCIA PARA ATIVAÇÃO DA (A)  $\alpha$ -D-XILOSIDASE INDUZIDA EM PROTOPLASTOS XXFGol (a); FUCOSIL-LACTOSE (b) e XXLGol (c); (B)  $\beta$ -D-XILOSIDASE INDUZIDA EM PROTOPLASTOS XXLGol (a); XXGol (b); XXXGol (c) e FUCOSIL-LACTOSE (d).

### 3.3-DOSE DEPENDÊNCIA DA $\alpha$ -D-XILOSIDASE e $\beta$ -D-XILOSIDASE

Os protoplastos foram incubados na presença dos indutores, em concentrações até 100 nM, durante 15 min. Foram realizadas as medidas para detecção da  $\alpha$ -D-xilosidase e  $\beta$ -D-xilosidase nas misturas de proteínas obtidas. As curvas de dose dependência para a atividade  $\alpha$ -D-xilosidase (Fig. 20A) mostram curvas sinusoidais. O XXFGol, 2'-fucosil-lactose, e XXLGol (curvas a, b e c, respectivamente) apresentaram maior atividade a 0,1, 10 e 50 nM. O XXFGol e 2'-fucosil-lactose tiveram um  $R_{\max}$  de 3,3 e 2,3, respectivamente. O XXLGol não foi ativo de maneira significativa.

As curvas de dose dependência para a atividade  $\beta$ -D-xilosidase (Fig. 20B) foram estabelecidas para XXLGol, XXGol e XXXGol (curvas a, b e c, respectivamente) e 2'-fucosil-lactose (curva d). O XXLGol apresentou maior atividade ( $R_{\max} = 2,6$ ; 50 nM), porém a uma alta concentração. Fucosil-lactose, XXXGol e XXGol ( $R_{\max} = 1,8$ ) a 0,1; 0,5 e 5 nM, todos ativando fracamente a  $\beta$ -D-xilosidase.

As curvas de dose dependência para  $\beta$ -D-galactosidase mostram que os indutores testados XXFGol e XXLGol foram inefetivos no tempo e concentrações utilizados.

As diferenças na modulação da  $\alpha$ -D-xilosidase,  $\beta$ -D-xilosidase e  $\beta$ -D-galactosidase, parecem estar relacionadas com a regulação da degradação da xiloglucana na parede celular. Segundo Lorence e Fry (1993), o controle da relação entre degradação e reconstituição da parede celular pode ser realizado por um sistema de controle da modulação da atividade XET, a qual estaria intimamente ligada a atividade hidrolase ( $\alpha$ -D-xilosidase,  $\beta$ -D-glucosidase). Através da ação destas duas enzimas pode-se reconstituir o substrato aceptor da XET. A  $\alpha$ -D-xilosidase serviria para o desbloqueio para ação posterior da  $\beta$ -D-glucosidase, podendo a  $\alpha$ -D-xilosidase agir antes ou após a  $\beta$ -D-galactosidase.

Observa-se que a ativação  $\alpha$ -D-xilosidase é dependente da unidade de fucose da cadeia lateral (Fanutti *et al.*, 1991,1996; Yoshikawa *et al.*, 1993 a,b; Edwards *et al.*, 1988).

A atividade  $\beta$ -D-xilosidase, por sua vez, está relacionada com a resposta de defesa da planta, sendo induzida por XXFGol, atividade esta que foi também induzida em *Rubus fruticosus* quando da utilização de galacturonídeo como indutor, demonstrando ser esta resposta inespecífica em *R. fruticosus* (Dinand *et al.*, 1997).

### 3.4-MODULAÇÃO DA ATIVIDADE (1,4)- $\beta$ -D-GLUCANASE POR XXLGol

A atividade (1,4)- $\beta$ -D-glucanase está relacionada com vários aspectos fisiológicos do crescimento de plantas, como o enfraquecimento da parede celular primária. Foi proposto por Hayashi *et al.* (1984) que a (1,4)- $\beta$ -D-glucanase é induzida, *in vivo*, por auxina e secretada para superfície interna da parede celular primária. O efeito de XXLGol (até 100 nM) sobre a atividade (1,4)- $\beta$ -D-glucanase induzida por 2,4-D e GA<sub>3</sub> a 10 nM foi analisado em protoplastos em incubação de 15 min. Os resultados foram analisados considerando-se a percentagem de ativação ou inibição da(1,4)- $\beta$ -D-glucanase nas diferentes concentrações de XXLGol. A atividade (1,4)- $\beta$ -D-glucanase induzida por 2,4-D e GA<sub>3</sub> apresentou um R<sub>max</sub> de 1,2 e 1, respectivamente. A ativação mediada por 2,4-D (Fig. 21, curva a) apresentou-se amplificada, sendo que a ativação máxima se dá a 0,1 nM de XXLGol. Entretanto a ativação mediada por GA<sub>3</sub> (Fig. 21, curva b) é dependente da concentração tendo-se ativação somente a alta concentração, sendo que a maior ativação foi obtida com XXLGol a 10 nM, havendo inibição da (1,4)- $\beta$ -D-glucanase a baixas concentração de XXLGol. A atividade (1,4)- $\beta$ -D-glucanase mediada por 2,4-D ou por GA<sub>3</sub> foi modulada pela concentração de XXLGol.

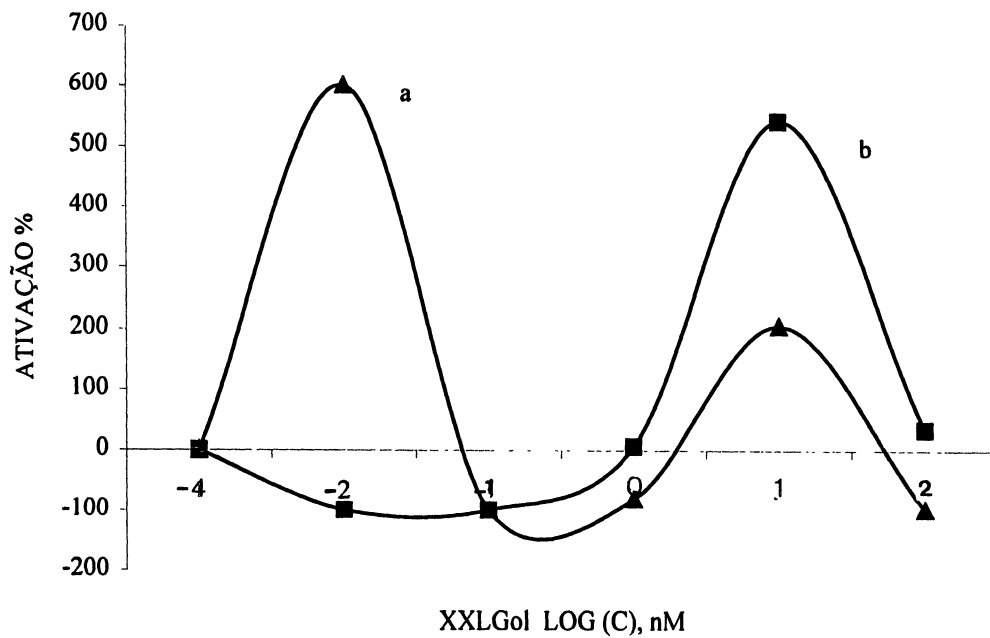


FIGURA 21- EFEITO DO XXLGol SOBRE A INDUÇÃO DE ATIVIDADE 1,4- $\beta$ -D-GLUCANASE MEDIADA POR 2,4-D (CURVA a) E GA<sub>3</sub> (CURVA b) A 10 nM, EM PROTOPLASTOS DE *Rubus fruticosus*.

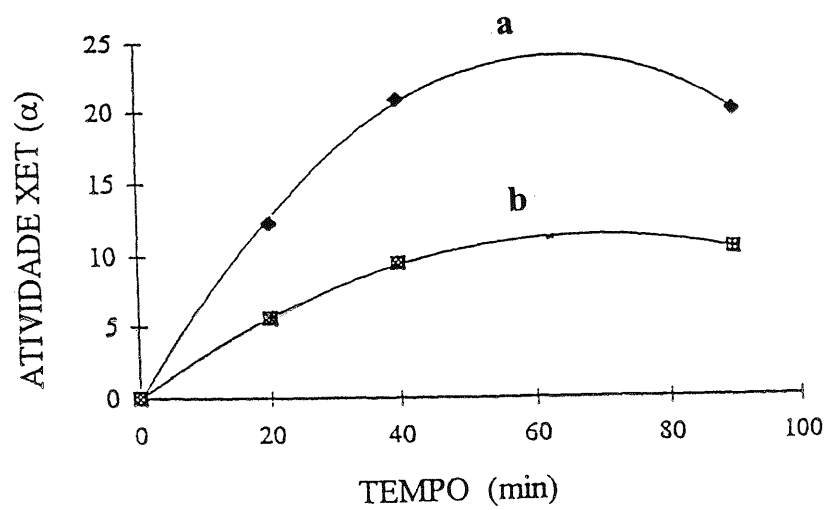
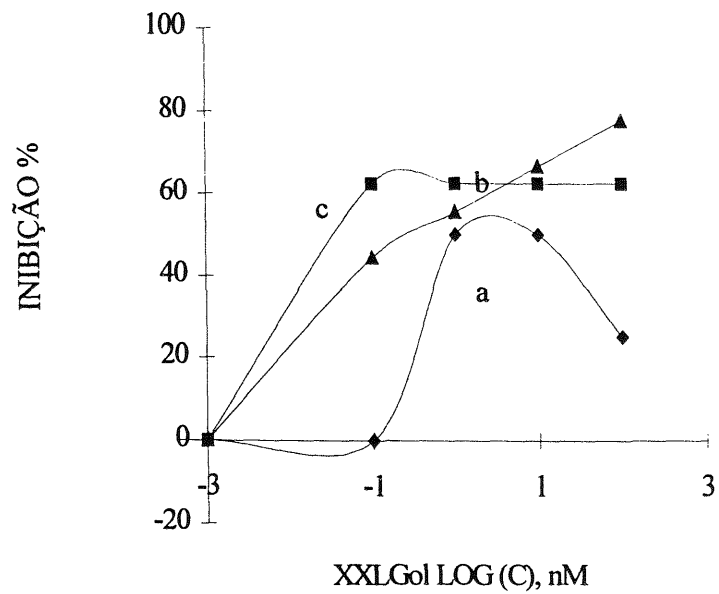


FIGURA 22 – ATIVIDADE XET INDUZIDA POR GA<sub>3</sub> (a) EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*, controle (b).

A



B

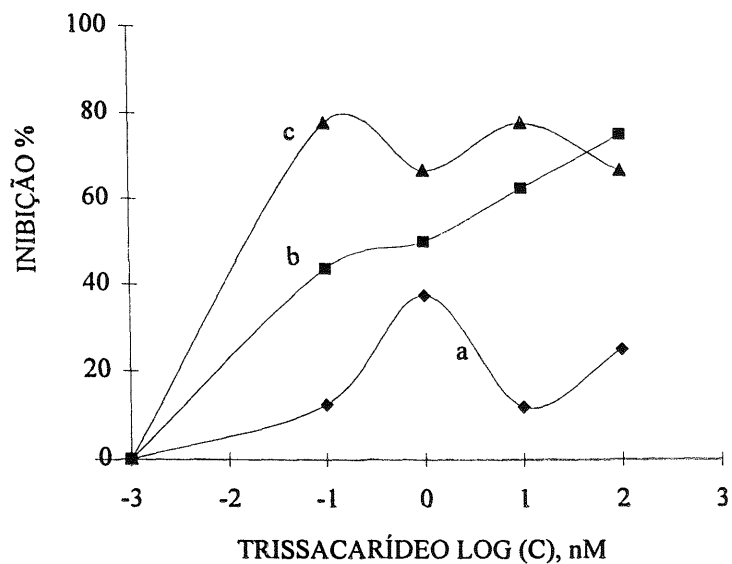


FIGURA 23 – EFEITO DE XXLGoL (A) E DO METIL TRISSACARÍDEO (B) SOBRE A ATIVAÇÃO  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*, NA PRESENÇA DE 5 (a), 10 (b) E 50 (c) nM DE ÁCIDO SALICÍLICO

### 3.5-ATIVIDADE XET EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*.

McDougall e Fry (1990) identificaram uma transglicosilase em tecidos de vegetais superiores e de Briofitas em crescimento, utilizando uma xiloglucana como substrato. A xiloglucana endotransglicosilase XET foi ensaiada por diversos métodos, utilizando um aceptor fluorescente (Nishitani e Tominaga, 1992), através da determinação viscosimétrica (Maclachlan *et al.*, 1988) ou colorimétrico (Sulova *et al.*, 1995). No presente trabalho ensaiou-se a atividade XET em protoplastos de *R. fruticosus* utilizando-se a indução com GA<sub>3</sub> (500 nM), 30 min. Foi utilizado XXLG~BSA como aceptor, conforme descrito em Materiais e Métodos (pg. 45), sendo a taxa de incorporação de 50%, ou seja 25 moles de XXLGol fixado por mol de BSA. Para XG~DIG o acoplamento também foi determinado em relação a quantidade de açúcar (~50%). Quando da reação de transglicosilação partes do polímero são transferidos para o oligossacarídeo.

A quantidade de DIG ligado ao polímero foi avaliada de forma indireta utilizando-se uma seqüência de anticorpos, dosando-se a atividade peroxidase que é diretamente proporcional a quantidade de DIG ligada e conseqüentemente proporcional a atividade XET. A Figura 22 mostrou a velocidade da reação XET em termos de  $\alpha$ , que foi escolhido por restrições no método imunoenzimático, sendo que não é proporcional ao valor absoluto de atividade XET ( $\alpha$  é o valor da tangente das curvas peroxidase). A velocidade inicial é 2 vezes mais elevada para a atividade induzida por GA<sub>3</sub> (curva a) do que para o controle (curva b). Este resultado está de acordo com o esperado visto que GA<sub>3</sub> regula a alongação dos tecidos em muitas espécies vegetais.

### 3.6-EFEITO DO ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE A INDUÇÃO $\alpha$ -L-FUCOSIDASE.

Estudos têm demonstrado que o ácido salicílico pode ser um fator de controle em vias de transdução de sinais que induzem mecanismos de resistência em

plantas, bem como em outros efeitos como a produção de calor e a floração (Enyedi *et al.*, 1992; Raskin, 1992).

A partir do resultado positivo (Fig. 18B) da indução da atividade  $\alpha$ -L-fucosidase com ácido salicílico 50 nM, 30 min ( $R_{\max} = 2,5$ ), foram realizados ensaios preliminares para verificar o efeito deste. Em concentrações de 5, 10 e 50 nM seu efeito indutivo apresentou  $R_{\max}$  de 1; 2 e 2,3 respectivamente. As curvas de dose dependência XXLGol (Fig. 23A) e o trissacarídeo (Fig. 23B), em concentrações até 100 nM dos oligossacarídeos em presença de diferentes concentrações de ácido salicílico, foram apresentadas em percentagem de inibição e mostraram que a atividade  $\alpha$ -L-fucosidase é inibida em qualquer concentração de XXLGol e trissacarídeo utilizado.

O ácido salicílico 5 nM apresentou uma curva com concentração ótima de inibição entre 0,1 e 1 nM (40% de inibição) para XXLGol e de 1 nM para o trissacarídeo, havendo uma variação do efeito inibitório com a concentração de oligossacarídeo. Em concentração mais elevada de ácido salicílico (10 nM), verificou-se aumento de inibição já em concentração de 0,01 nM de XXLGol e de trissacarídeo, atingindo um platô. Efeito similar ocorre a 50 nM.

Pode-se observar que apesar dos oligossacarídeos apresentarem aspectos estruturais distintos, ocorre o mesmo efeito sobre a indução  $\alpha$ -L-fucosidase mediada por ácido salicílico. Este comportamento sugere que o ácido salicílico não seja reconhecido a nível de membrana plasmática, mas sim que ele participe da cascata de transdução de sinais, sendo incorporado à célula e podendo ser um ponto de controle. Estes dados são apenas preliminares e devem ser confirmados.

### 3.7-MODULAÇÃO DA ATIVIDADE $\alpha$ -L-FUCOSIDASE

A partir dos resultados obtidos na triagem das hidrolases, escolheu-se a atividade  $\alpha$ -L-fucosidase como marcador biológico, devido a hipótese de que um dos

sistemas de controle do crescimento celular seja a presença ou não de fucose na estrutura da xiloglucana da parede, a qual está intimamente ligada a celulose como já abordado na Introdução (pg. 10).

Os protoplastos de *R. fruticosus* foram incubados por 15 min na presença dos seguintes efetores: xiloglucana, XXLGol, XXXGol, XXFGol e o trissacarídeo [ $\alpha$ -L-fucopiranosil- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-metil- $\alpha$ -D-xilopiranosídeo]. Para determinar as curvas de dose dependência para a ativação  $\alpha$ -L-fucosidase, os efetores foram utilizados em concentrações que variaram de 0,1 a 100 nM (Fig. 24). Foram obtidas curvas sinusoidais em todos os casos. As atividades mais altas foram similares ( $R_{\max} = 3$ ) para XXXGol, XXFGol e XXLGol (curvas c, b e a) a 0,1, 1 e 5 nM, respectivamente. As concentrações ótimas para o trissacarídeo Fuc-Gal-MeXil e o polímero foram de 10 e 50 nM respectivamente, sendo para ambos  $R_{\max}$  igual a 2.

A determinação do tempo de ativação da  $\alpha$ -L-fucosidase em protoplastos e/ou células de *R. fruticosus* foi realizada em presença dos indutores em suas concentrações ótimas (Fig. 25). A viabilidade dos protoplastos (ou células) foi de 90 e 95% respectivamente, ao longo do experimento. Quando os protoplastos foram tratados com XXLGol, XXFGol, XXXGol e o trissacarídeo Fuc-Gal-MeXil (Fig. 25, curvas a, b, d e e, respectivamente), a resposta detectada foi bifásica e trifásica em relação às suas cinéticas. As respostas de tempo curto em protoplastos, foram de 10, 20 e 45 min para os oligossacarídeos XXXGol, XXLGol e XXFGol. A resposta do trissacarídeo foi retardada a 30 min e 6 h. Quando os indutores foram comparados em relação a seu valor de  $R_{\max}$ , a ordem de eficiência entre 10 e 30 min foi XXFGol>XXXGol~trissacarídeo Fuc-Gal-MeXil>XXLGol, com valor de  $R_{\max}$  de 5,8; 4,1 e 3. Depois de 45 min, a ordem foi XXXGol>XXLGol>XXFGol, com  $R_{\max}$  de 6,5; 4,7 e 1,8, respectivamente. Isto significa

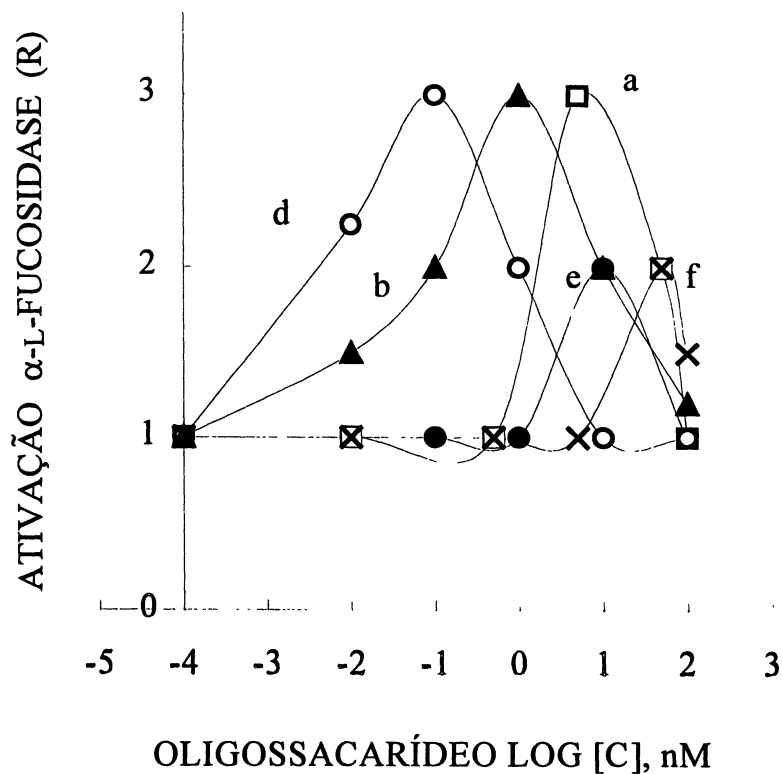


FIGURA 24- CURVAS DE DOSE DEPENDÊNCIA PARA A INDUÇÃO DA  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE PELO OLIGOSSACARÍDEO DE XILOGLUCANA XXLogol (a), XXFGol (b), XXXGol (d), FucGal-MeXil (e) E XILOGLUCANA (f) EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*.

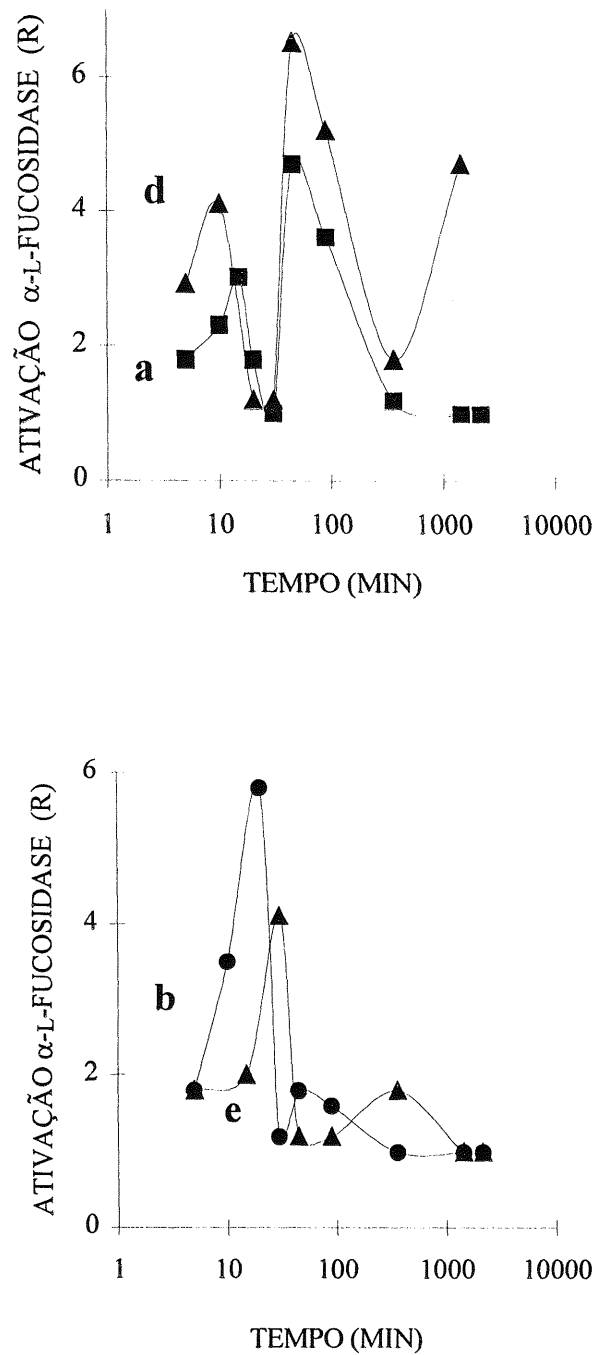


FIGURA 25- CURVAS DE TEMPO PARA A INDUÇÃO DA  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE PELO OLIGOSSACARÍDEO DE XILOGLUCANA XXLGol (a), XXFGol (b), XXXGol (d) e FucGal-MeXil (e) EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*.

que é necessário apenas 10 min para o XXXGol desencadear uma resposta, entretanto para XXLGol e XXFGol são necessários 15 e 20 min, respectivamente, e para o trissacarídeo Fuc-Gal-MeXil 30 min. A incubação em tempo mais prolongado, até 96 h, demonstrou um aumento dos valores das respostas de indução para XXXGol e XXGol ( $R_{max}$  de 6 e 8, respectivamente). A indução da  $\alpha$ -L-fucosidase em protoplastos pelo XXLGol, em presença do inibidor de transcrição (cicloheximida, 1  $\mu$ M) ou de tradução (actinomicina D, 1  $\mu$ g/mL) foi testada, verificando-se que a resposta de tempo curto, até 45 min, foi mantida. Enquanto que o tratamento de tempo longo resultou em uma resposta consideravelmente atenuada, 40 ou 50% de inibição em 96 h. Quando o experimento foi repetido com as células em suspensão observou-se uma elevada resposta do controle, e a ativação da enzima foi largamente atenuada até a detecção de um  $R_{max}$  de 1,2 e 3,5. Oligossacarídeos estruturalmente não relacionados com a xiloglucana, tais como oligogalacturonídeos de GP 10 a 15 e maltopentaose, foram também usados como indutores potenciais de  $\alpha$ -L-fucosidase, mas falharam para promover esta resposta em protoplastos ou células de *R. fruticosus*.

As respostas em protoplastos tiveram uma natureza muito rápida e transitória, sugerindo um sinal precoce da cascata de transdução. No caso da indução  $\alpha$ -L-fucosidase isto foi especialmente verdadeiro, pois a resposta iniciou a poucos minutos depois da adição dos efetores. O tratamento até 180 min não mudou a quantidade total de proteína extraída, mas afetou a atividade enzimática específica. A indução de tal resposta não necessita a presença das paredes celulares, e foi mantida na presença dos inibidores de transcrição e tradução. Estes resultados fornecem subsídios consistentes que fortalecem a hipótese de um receptor para xiloglucana na membrana plasmática. Extensivas pesquisas dos açúcares sinalizadores têm revelado uma seqüência de eventos bioquímicos, incluindo transcrição e tradução de genes específicos, resultando na indução da síntese *de novo* de

enzimas, mas o processo inicial da percepção e transdução dos sinais, não foi ainda elucidado (Coté e Hahn, 1994).

### 3.8-EFEITO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DERIVADOS DA XILOGLUCANA NA RESPOSTA $\alpha$ -L-FUCOSIDASE INDUZIDA POR 2,4-D E GA<sub>3</sub>.

Os oligossacarídeos fucosilados de xiloglucana têm demonstrado atividade antiauxínica, a qual pode estar associada a estrutura do oligossacarídeo, conforme discutido na Introdução (pg. 27), assim analisou-se aqui esta relação estrutura-atividade. Os oligossacarídeos XXFGol, XXLGol, XXXGol e o trissacarídeo Fuc-Gal-MeXil em concentrações até 100nM foram testados em protoplastos de *R. fruticosus*, para verificar seus efeitos na atividade  $\alpha$ -L-fucosidase estimulada por auxina. A indução da enzima foi analisada com 2,4-D a 10, 50 e 100 nM, a fim de estabelecer-se a melhor concentração de hormônio para a modulação  $\alpha$ -L-fucosidase. Foi observado que as respostas mais significativas deram-se com 2,4-D 10 nM que apresentou um  $R_{max}$  1,5. Um dos objetivos aqui foi determinar quais unidades glicosil são necessárias para modificar a resposta  $\alpha$ -L-fucosidase. As curvas de dose dependência na presença de 10 nM de 2,4-D indicaram que XXFGol e o trissacarídeo Fuc-Gal-MeXil apresentam um comportamento similar (Fig. 26A, curvas b e e respectivamente). A ausência de uma unidade de fucose no XXLGol (quando comparado com XXFGol), resultou na indução da atividade enzimática, com um  $R_{max}$  de 6 (Fig 26B, curva a), por outro lado XXXGol que é destituído da cadeia lateral de fucose e galactose não é ativo (Fig. 26B, curva d). As curvas mostradas na Fig. 26C correspondem as percentagens de modulação da  $\alpha$ -L-fucosidase induzida por 2,4-D e mostram claramente que a unidade terminal de galactose do XXLGol é o aspecto estrutural necessário para promover uma resposta  $\alpha$ -L-fucosidase (curva a). A perda da unidade de

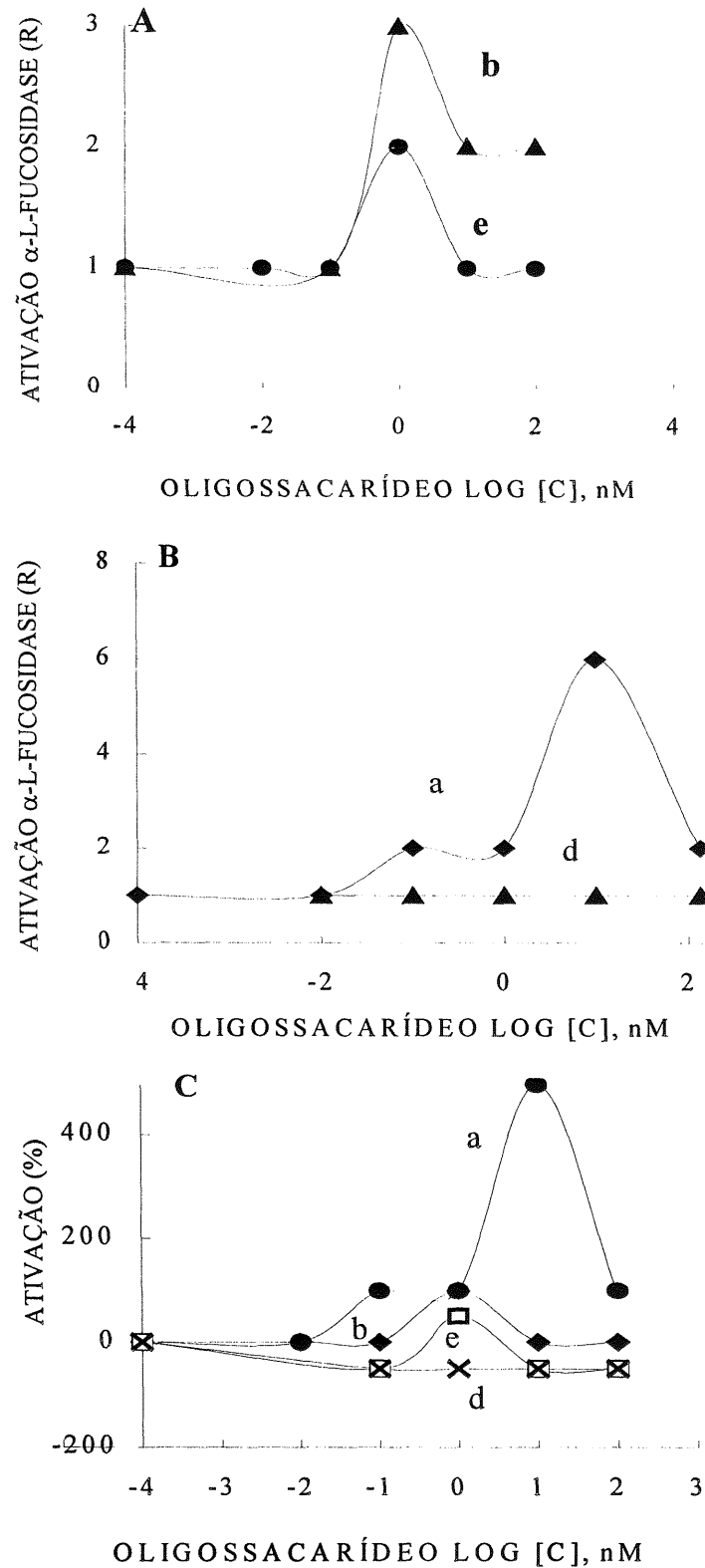


FIGURA 26 - EFEITO DO XXLGol (a), XXFGol (b), XXXGol (d) E O TRISSACARÍDEO (e) NA INDUÇÃO  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE ESTIMULADA POR 2,4-D EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*. Os resultados são expressos em valor de R em em A e B e porcentagem em C.

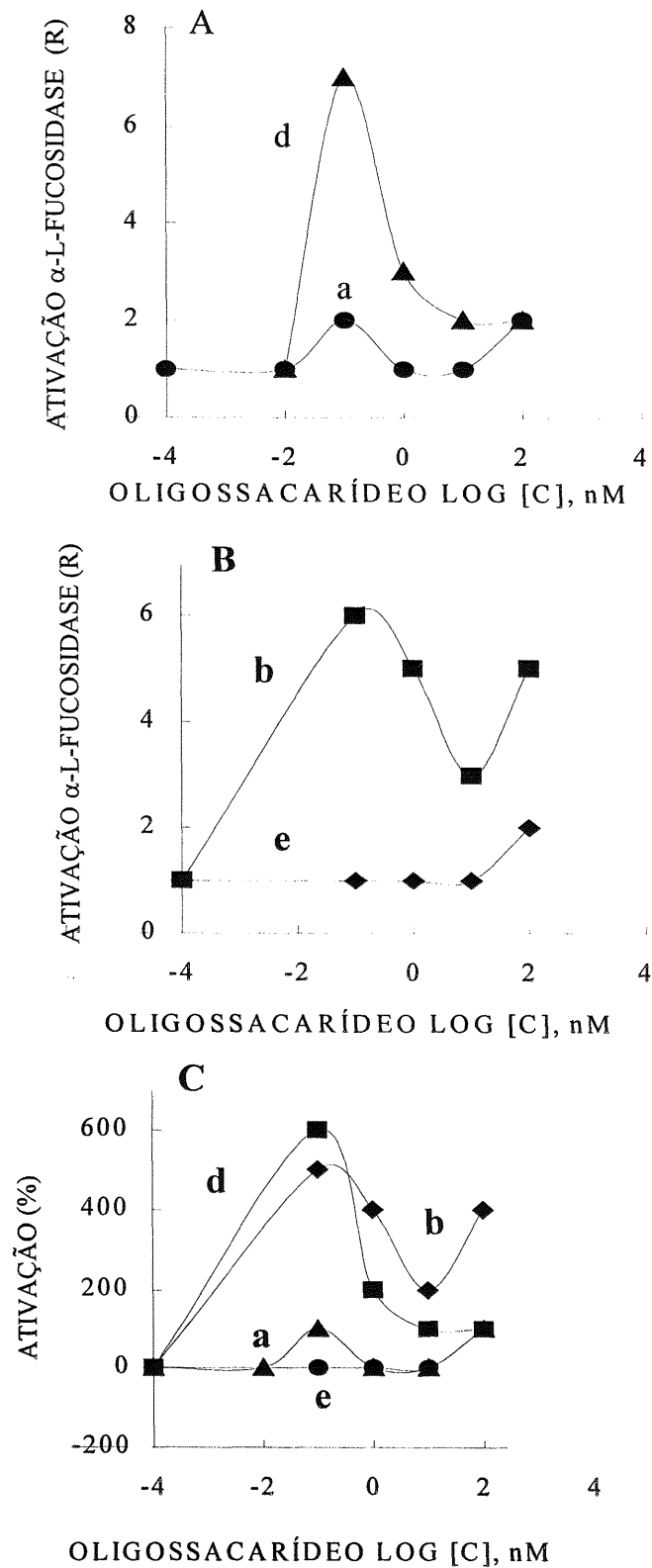


FIGURA 27 - EFEITO DO XXLGol (a), XXFGol (b), XXXGol (d) E O TRISSACARÍDEO (e) NA INDUÇÃO  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE ESTIMULADA POR GA<sub>3</sub> 10 nM, EM PROTOPLASTOS DE *R. fruticosus*. Os resultados são expressos em valor de R em A e B e em percentagem em C.

galactose leva a um comportamento com somente atividade inibitória (curva d). A presença da unidade de fucose ligada na posição O-2 da unidade de galactose, como no XXFGol (curva b) e no trissacarídeo (curva e) causaram tanto inibição como ativação da enzima dependendo da concentração do efetor, sendo o trissacarídeo inibidor mais potente.

É sabido que GA<sub>3</sub> está correlacionado com o aumento dos segmentos de caules *in vivo* e com o aumento da atividade específica da XET, porém nada foi encontrado na literatura sobre a relação deste hormônio com a atividade da  $\alpha$ -L-fucosidase.

A ativação da  $\alpha$ -L-fucosidase em protoplastos de *R. fruticosus* com GA<sub>3</sub> 10 nM por 15 min, teve também um R de 1,5. As curvas de dose dependência dos oligossacarídeos na presença de GA<sub>3</sub> 10 nM, mostraram que XXXGol (Fig. 27A, curva d) e XXFGol (Fig. 27B, curva b) foram altamente efetivos no aumento da atividade enzimática, com R de 7 e 6 respectivamente. XXLGol (Fig. 27A, curva a) foi menos ativo (R = 2) e o trissacarídeo não promoveu um aumento da resposta  $\alpha$ -L-fucosidase (Fig. 27B, curva e). As curvas de dose dependência para XXXGol e XXFGol foram também analisadas com 100 nM de GA<sub>3</sub> demonstrando uma diminuição de 50% na atividade em relação aos valores obtidos na presença de 10 nM. No caso do trissacarídeo e XXLGol a concentração de GA<sub>3</sub> não alterou a resposta ( $R_{max}$  igual a 1 e 2, respectivamente).

A Figura 27C apresenta as percentagens de ativação da  $\alpha$ -L-fucosidase induzida por GA<sub>3</sub>, evidenciando que a presença das duas unidades de xilosil ligadas na penúltima e última unidade de glucose são necessárias para a atividade biológica (curvas d e b), mas a unidade de galactose na posição 2 antagoniza o efeito de indução da unidade de xilose, sendo então XXLGol pouco efetivo (curva a). É significativo que a presença da unidade terminal de fucose no XXFGol (curva b) pode somente restaurar parcialmente um aspecto que simula a conformação da cadeia principal do XXXGol. Como o trissacarídeo não foi ativo (curva e) ficou confirmada a importância das demais unidades de xilose.

Os resultados apresentados para suspensão de células ou protoplastos de *R. fruticosus* demonstraram que os oligossacarídeos de xiloglucana são moléculas sinalizadoras pela sua habilidade de aumentar a atividade da  $\alpha$ -L-fucosidase induzida por 2,4-D ou GA<sub>3</sub>. A atividade auxínica e/ou anti-auxínica dos oligossacarídeos de xiloglucosil nos sistemas biológicos é totalmente diferente do que foi previamente apresentado na literatura e a resposta induzida por GA<sub>3</sub> confirma os resultados obtidos por Warneck e Seitz (1993). As respostas biológicas dependeram de vários parâmetros tais como: os aspectos estruturais dos oligossacarídeos de xiloglucosil e suas cadeias laterais, a natureza do hormônio utilizado e a concentração de açúcar.

A presença de sítios de ligação de alta afinidade, receptores putativos para açúcares [hepta  $\beta$ -glucosídeo (Cosio *et al.*, 1992); *N*-acetilquitooligossacarídeo (Shibuya *et al.*, 1993)] e o trissacarídeo determinante humana H do tipo I (Liénart *et al.*, 1992), tem sido demonstrada em plantas, e a proteína de ligação para o elicitor  $\beta$ -glucana de *Phytophthora* foi clonada (Umemoto *et al.*, 1997), porém o processo de percepção e transdução de sinais oligossacarídicos precisa ser elucidado.

O presente estudo confirmou que os oligossacarídeos de xiloglucana podem ter efeitos dependentes de hormônio em um sistema diferente que em bioensaios de caule de ervilha. Previamente foram apresentados resultados somente da atividade antiauxínica em protoplastos de cenoura (Emmerling e Seitz, 1990) ou da habilidade da fucosil lactose de controlar a morfogênese em culturas de embriões de trigo (Pavlova *et al.*, 1992). Além disso, o efeito de XXXG e XXFG na elongação foi correlacionado com suas propriedades viscoelásticas em ervilhas (Cutillas-Iturralde e Lorences, 1997). McDougall e Fry (1990) e Augur *et al.* (1995) especularam que a celulase e a  $\alpha$ -L-fucosidase participam na regulação do crescimento de plantas pelo controle tanto da hidrólise da xiloglucana como da concentração dos oligossacarídeos fucosilados. Essas hipóteses são consistentes com os

---

resultados deste trabalho que mostram que o tratamento de protoplastos de *R. fruticosus* com oligossacarídeos de xiloglucana na presença ou ausência de hormônio modulam fortemente a atividade  $\alpha$ -L-fucosidase em poucos minutos. Por outro lado a  $\alpha$ -L-fucosidase isolada de nasturtium (Farkas *et al.*, 1991; Augur *et al.*, 1995; Hoson *et al.*, 1995) foi capaz de hidrolisar a unidade terminal de fucose do XXFGol, porém não clivou *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucosídeo. Em contraste a enzima obtida de *R. fruticosus* hidrolisa o substrato artificial, tal qual as  $\alpha$ -L-fucosidases de mamíferos (Johnson e Alhdeff, 1991).

## **V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scient. Am.**, v. 232, p. 80-94, 1975.
- ALDINGTON, S. e FRY, S.C. Oligosaccharins. **Adv. Bot. Res.**, v. 19, p. 1-93, 1993.
- ARMAND, S., DROUILLARD, S., SCHÜLEIN, M., HENRISSAT, B. e DRIGUEZ, H. A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n°. 77, p. 2709-2713, 1997.
- ARROWSMITH, D.A. e DE SILVA, J. Characterisation of two tomato fruit-expressed cDNAs encoding xyloglucan endo-transglycosylase. **Plant Mol. Biol.**, v. 28, p. 391-403, 1995.
- AUGUR, C., YU, L., SAKAI, K., OGAWA, T., SINAŮ, P., DARVILL, A.G. e ALBERSHEIM, P. Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. **Plant Physiol.**, v. 99, p.180-185, 1992.
- AUGUR, C., STIEFEL, V., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. e PUIGDOMENECH, P. Molecular cloning and pattern of expression of an  $\alpha$ -L-fucosidase gene from pea seedlings. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n°. 42, p. 24839-24843, 1995.
- AYERS, A.R., EBEL, J., FINELLE, F., BERGER, N. e ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interations. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present inthe extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiol.**, v. 57, p. 751-759, 1976a.
- AYERS, A.R., EBEL, J. e ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interations. X. Fractions and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiol.**, v. 57, p. 760-765, 1976b.
- AYERS, A.R., VALENT, B., EBEL, J. e ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interations. XI. Compositon and structure of wall- released elicitor fractions. **Plant Physiol.**, v. 57, p. 766-774, 1976c.

- BANDURSBI, R.S., SCHULZE, A. e COHEN, J.D. Photoregulation of the ratio of ester to free indole-3-acetic acid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 79, p. 1219-1223, 1977.
- BARBIER-BRYGOO, H., EPHRITKHINE, G., KLÄMBT, D., MAUREL, C., PALME, K., SHELL, J. e GUERN, J. Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. **Plant J.**, v. 1, n°. 1, p. 83-93, 1991.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 22, p. 87-108, 1968.
- BeMILLER, J.N. Chitin. Whistler, R.L., Bemiller, J.N. e Wolfrom, J.N. eds In. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. v. V, Academic Press, New York, p. 103-107, 1965.
- BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA C., PETITJEAN A. e LEJEUNE, P. Physiological signals that induce flowering. **Plant Cell**, v. 5, p. 1147-1155, 1993.
- BLUMENKRANTZ, N. e ASSBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.
- BOHN, J.A. e BeMILLER, J.N. (1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BRACCINI, I., PENHOAT, C.H., MICHON, V., GOLDEBERG, R., CLOCHARD, M., JARVIS, M.C., HUANG, Z.-H. e GAGE, D.A. Structural analysis of cyclamen seed xyloglucan oligosaccharides using cellulase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, v. 276, p.167-181, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BUCKERIDGE, M.S., CROMBIE, H.J., MENDES, C.J.M., REID, J.S.G., GIDLEY, M.J. e VIEIRA, C.C.J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 233-237, 1997.
- BUCKERIDGE, M.S. e REID, J.S.G. Purification and properties of a novel  $\beta$ -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Planta**, v. 192, p. 502-511, 1994.
- BUCKERIDGE, M.S., ROCHA, D.C., REID, J.S.G. e DIETRICH, S.M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savannah and forest populations. **Physiol. Plant.**, v. 86, p. 145-151, 1992.
- CAMIRAND, A., BRUMMEL, D. e MACLACHLAN, G. Fucosylation of xyloglucan: localization of the transferase in dictyosomes of pea stem cells. **Plant Physiol**, v. 84, p. 753-756, 1987.
- CARNEIRO, E. Identificação de glicosídeos na *Hymenaea martiana* Hayne, A. **Estrutura e atividades farmacológicas**. Tese mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1989, 211p.
- CARPITA, N.C. e GIBEAUT, D.M. structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, v. 3, n $^{\circ}$ . 1, p. 1-30, 1993.
- CARPITA, N. C. The biochemistry of the "growing" plant cell wall. In: **Physiology of cell expansion during plant growth**. Cosgrove, D.J. e Knievel, D.P. eds. Rockville, MD. Am. Soc. Palnt Physiol., p. 28-45, 1987.
- CHEONG, J.-J., BIRBERG, W., FÜGEDI, P., PILOTTI, A., GAREGG, P.J., HONG, N., OGAWA, T. e HAHN, M.G. Structure-activity relationships of oligo- $\beta$ -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. **Plant Cell**, v. 3, p. 127-136, 1991.

- CLELAND, R.E. Wall extensibility: hormones and wall extension. In: **Encyclopedia of Plant Physiol.**, 13 B, p. 255-273, 1981.
- COIMBRA, M.A., RIGBY, N.M., SELVENDRAN, R.R. e WALDRON, K.W. investigation of the occurrence of xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of olive pulp. **Carbohydr. Polym.**, v. 27, p. 277-284, 1995.
- COSIO, E.G., FREY, T. e EBEL, J. Identification of a high-affinity binding protein for a hepta- $\beta$ -glucoside phytoalexin elicitor in soybean. **Eur. J. Biochem.**, v. 204, p. 1115-1123, 1992.
- COTE, F. e HAHN, M.G. Oligosaccharins; structures and signal transduction. **Plant Mol. Biol.**, v. 26, p. 1379-1411, 1994.
- CUTILLAS-ITURRALDE, A. e LORENCES, E.P. effect of xyloglucan oligosaccharides on growth, viscoelastic properties, and long-term extension of pea shoots. **Plant Physiol.**, v. 113, p. 103-109, 1997.
- DARVILL, A.G. e ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 35, p. 243-275, 1984.
- DARVILL, A.G., AUGUR, C., BERGMANN, C., CARLSON, R.W., CHEONG, J.-J., EBERHARD, S., HAHN, M.G., LÓ, V.-M., MARFÀ, V., MEYER, B., MOHNEN, D., O'NEIL, M.A., SPIRO, M.D., HALBEEK, H., YORK, W.S. e ALBERSHEIM, P. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. **Glycobiology**, v. 2, n° 3, p. 181-198, 1992.
- DELBARRE, A., MULLER, P., IMHOFF, V. e GUERN, J. comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. **Planta**, v. 198, p. 532-541, 1996.

- DINAND, E., EXCOFFIER, G., LIENART, Y. e VIGNON, M.R. Two rhamnogalacturonide tetrasaccharides as signaling molecules in *Rubus* protoplasts or cells, isolated from semiretted flax fibers. **Plant Physiol.**, v. 115, n°. 2, p. 791-801, 1997.
- DIXON, R.A. The phytoalexin responses: elicitation, signaling and control of host expression. **Biol. Res.**, v.61, p.239-291, 1986.
- DOWNS, F. e PIGMAN, W. Determination of *O*-acetyl groups by Hestrin method. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 7, p. 241-243, 1967.
- DRIOUCH, A., ZHANG, G.F. e STAEHELIN, L.A. effect of brefeldin A on the structure of the golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cells. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 1363-1373, 1993.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. e SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUTTA, S., BRADFORD, K.J. e NEVINS, D.J. Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiol.**, v. 104, p. 623-628, 1994.
- EDWARDS, M., BOWMAN, Y.J.L., DEA, I.C.M. e REID, J.S.G. A  $\beta$ -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons purification, properties, and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n°. 9, p. 4333-4337, 1988.
- EMMERLING, M. e SEITZ, H.U. Influence of a specific xyloglucan- nonasaccharide derived from cell walls of suspension-cultured cells of *Daucus carota* L. on regenerating carrot protoplasts. **Planta**, v.182, p. 174-180, 1990.

- ENYEDI, A.J., YALPANI, N., SILVERMAN, P. e RASKIN, I. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 2480-2484, 1992.
- FAĬK, A., CHILESHE, C., STERLING, J. e MACLACHLAN, G. Xyloglucan galactosyl- and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 245-254, 1997.
- FANUTTI, C., GIDLEY, M.J. e REID, J.S.G. A xyloglucan-oligosaccharide-specific  $\alpha$ -D-xylosidase or exo- $\alpha$ -xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. **Planta**, v. 184, p. 137-147, 1991.
- FANUTTI, C., GIDLEY, M.J. e REID, J.S.G. Substrate subsite recognition of the xyloglucan endo-transglycosylase or xyloglucan-specific endo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum Majus* L.) seeds **Planta**, v. 200, p. 221-228, 1996.
- FARKAS, V., HANNA, R. e MACLACHLAN, G. Xyloglucan oligosaccharide  $\alpha$ -L-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds. **Phytochemistry**, v. 30, n $^{\circ}$ . 10, p. 3203-3207, 1991.
- FARKAS, V., SULOVA, Z., STRATILOVA, E., HANNA, R. e MACLACHLAN, G. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 298, n $^{\circ}$ . 2, p. 365-370, 1992.
- FINKENSTADT, V.L., HENDRIXSON, T.L. e MILLANE, R.P. Models of xyloglucan binding to cellulose microfibrils. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 14, n $^{\circ}$ . 4 e 5, p. 601-611, 1995.
- FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n $^{\circ}$ . 21, p. 1-11, 1989.

- FRY, S.C., ALDINGTON, S., HETHERINGTON, P.R. e AITKEN, J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1-5, 1993.
- FRY, S.C., SMITH, R.C., RENWICK, K.F., MARTIN, D.J., HODGE, S.K. e MATTHEWS, K. Xyloglucan endotransglycosylase a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochem. J.**, v. 282, p. 821-828, 1992.
- FRY, S.C., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G., HAYASHI, T., JOSELEAU, J.-P., KATO, Y., LORENCES, E.P., MACLACHLAN, G.A., McNEIL, M., MORT, A., REID, J.S.G., SEITZ, H.U., SELVENDRAN, R.R., VORAGEN, A. G.J. e WHITE, A.R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plant.**, v. 89, p. 1-3, 1993.
- GIBEAUT, D.M. e CARPITA, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides **FASEB J.**, v. 8, nº. 12, p. 904-915, 1994.
- GLOCKER, M.O., SU, H. e DEINZER, M.L. Structure elucidation of hop plant (*Humulus lupulus*) phytoalexin elicitors by fast atom bombardment mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, p. 1558-1565, 1993.
- GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 38, p. 13-104, 1981.
- GUIDLEY, M.J., LILLFORD, P.J., ROWLANDS, D.W., LANG, P., DENTINI, M., CRESCENZI, V., EDWARDS, M., FANUTTI, C. e REID, J.S.G. Structure and solution properties of tamarind seed polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 214, p. 299-314, 1991.
- GUILLÉN, R., YORK, W.S., PAULY, M., AN, J., IMPALLOMENI, G., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A.G. Metabolism of xyloglucan generates xylose-deficient oligosaccharide subunits of this polysaccharide in etiolated peas. **Carbohydr. Res.**, v. 277, p. 291-311, 1995.

- HAHN, M.G., BUCHELI, P., DOARES, S.H., O'NEILL, R.A., DARVILL, A. e ALBERSHEIM, P. The roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In: **Plant-microbe interactions. Molecular and genetic perspectives**. V. 3, Kosuge, T. e Nester, E.W., eds. New York, N.Y., 131-181 pp., 1989.
- HÄLLGREN, C. e HINDSGAUL, O. An aminated GDP-fucose analog useful in the fucosyltransferase catalyzed addition of biological probes on to oligosaccharide Chains. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 14, nº. 4 e 5, p. 453-464, 1995.
- HANTUS, S., PAULY, M., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. e YORK, W.S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 1-22, 1997.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HAYASHI, T. e TAKEDA, T. Compositional analysis of the oligosaccharide units of xyloglucans from suspension-cultured poplar cells. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, n. 9, p. 1707-1708, 1994.
- HAYASHI, T., WONG, Y. e MACLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose II. Partial hydrolysis by pea endo-1,4- $\beta$ -glucanases. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 605-610, 1984.
- HEIDRICH, G.L. Anions modify the response of guard-cell anion channels to auxin. **Planta**, v. 197, p. 546-552, 1995.
- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.**, v. 14, p. 1-233, 1953.
- HETHERINGTON, P.R. e FRY, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. **Plant Physiol**, v. 103, p. 987-992, 1993.

- HISAMATSU, M., IMPALLOMENI, G., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A.G. A new undecasaccharide subunit of xyloglucans with two  $\alpha$ -L-fucosyl residues. **Carbohydr. Res.**, v. 211, p. 117-129, 1991a.
- HISAMATSU, M., YORK, W.S., DARVILL, A.G. e ALBERSHEIM, P. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosyl residues. **Carbohydr. Res.**, v. 227, p. 45-71, 1992b.
- HOSON, T. Regulation of polysaccharide breakdown during auxin-induced cell wall loosening. **J. Plant. Res.**, v. 106, p. 363-381, 1993.
- HOSON, T., TABUCHI, A. e MASUDA, Y. Mechanism of xyloglucan breakdown in cell-walls of azuki bean epicotyls. **J. Plant Physiol.**, v. 147, p. 219-224, 1995.
- HUBER, D.J. e NEVINS, D.J. Partial purification of endo- and exo- $\beta$ -D-glucanase enzymes from *Zea mays* L. seedlings and their involvement in cell-wall autohydrolysis. **Planta**, v. 151, p. 206-214, 1981.
- HUSTACHE, G., MOLLARD, A. e BARNOUD, F. Culture illimitée d'une souche anergiée de *Rosa glauca* par la technique des suspensions cellulaires. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 281, p. 1381-1384, 1975.
- IINO, M. Short-term stimulation of growth induced by the apical application of IAA to intact maize coleoptiles. **Plant Cell Physiol.**, v. 37, n<sup>o</sup>. 1, p. 27-33, 1996.
- JOHNSON, S.W. e ALHADEFF, J.A. Mammalian alpha-L-fucosidases. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 99, p. 479-488, 1991.
- JOSELEAU, J.P., CARTIER, N., CHAMBAT, G., FAĬK, A. e RUEL, K. Structure features and biological activity of xyloglucans from suspension-culture plant cells. **Biochimie**, v. 74, p. 81-88, 1992.
- KANAI, R. e EDWARDS, G.E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and Crassulacean acid metabolism plants using an aqueous

- dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiol.**, v. 52, p. 484-490, 1973.
- KARÁCSONYI, S. e KOVACIK, V. Studies of the polysaccharides of *Populus alba* L.: isolation and characterisation of xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, v. 185, p. 199-210, 1989.
- KATO, Y. e WATANABE, T. Isolation and characterization of a xyloglucan from Gobo (*Arctium lappa* L.). **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, nº. 9, p. 1591-1592, 1993.
- KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.W., BAUER, W.D. e ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 188-197, 1973.
- KEEN, N.T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? **Science**, v. 187, p. 74-75, 1975.
- KHARE, D.P., HINDSGAUL, O. e LEMIEUX, R.U. The synthesis of monodeoxy derivatives of lacto-*N*-biose I and *N*-acetyl-lactosamine to serve as substrates for the differentiation of  $\alpha$ -L-fucosyl transferases. **Carbohydr. Res.**, v. 136, p. 285-308, 1995.
- KIDBY, D.K. e DAVIDSON, D.J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Anal. Biochem.**, v. 55, nº. 1, p. 321-325, 1973.
- KLECZKOWSKI, K. e SCHELL, J. Phytohormone conjugates: nature and function. **Critical Reviews in Plant sciences**, v. 14, nº. 4, p. 283-298, 1995.
- KUTSCHERA, U. e SCHOPFER, P. Evidence against the acid-growth theory of auxins action. **Planta**, v. 163, p. 483-493, 1985.

- LEE, Y.E. e ZEIKUS, J.G. Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 1235-1243, 1993.
- LEROUGE, P., ROCHE, P., FAUCHER, C., MAILLET, F., TRUCHET, G., PROMÉ, J.C. e DENARIE, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliotti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. **Nature**, v. 344, p. 781-784, 1990.
- LEVY, S., MACLACHLAN, G. e STAEHELIN, L.A. Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamic simulations. **Plant J.**, v. 11, n° 3, p. 373-386, 1997.
- LIENART, Y., DUBOIS-DAUPHIN, R., GAUTIER, C., KHITRI, M. e DRIGUEZ, H. Membrane binding sites for the human blood group H-type 2 determinant, an inducer of laminarinase activity in protoplasts of *Rubus fruticosus* L. **Planta**, v. 188, p. 506-512, 1992.
- LIENART, Y., GAUTIER, C. e DRIGUEZ, H. Immobilized sugar as abiotic inducers of  $\beta$ -D-glycanohydrolases in plant cells. **Plant Science**, v. 68, p. 197-202, 1990.
- LIMA, N.N., REICHER, F., CORRÊA, J.B.C., GANTER, J.L.M.S. e SIERAKOWSKI, M.-R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). **Ciênc. Cult.**, v. 45, n° 1, p. 22-26, 1993.
- LIMA, N.N., RECHIA, C.G.V., GANTER, J.L.M.S., REICHER, F. e SIERAKOWSKI, M.-R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan Isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n° 6, p. 413-415, 1995.
- LOHSE, G. e HEDRICH, R. Anions modify the response of guard-cell anion channels to auxin. **Plant**, v. 197, p. 546-552, 1995.

- LOPEZ, R., MONTEIRO, E., SANCHEZ, F., CANADA, J. e FERNANDEZ-MAYORALAS, A. Regioselective acetylation of alkyl  $\beta$ -D-xylopyranosides by use of lipases PS in organic solvents and application to the chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides. **J. Org. Chem.**, v. 59, p. 7027-7032, 1994.
- LORENCES, E.P. e FRY, S.C. Xyloglucan oligosaccharides with at least two  $\alpha$ -D-xylose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerisation of xyloglucan. **Physiol. Plant.**, v. 88, p. 105-112, 1993.
- LORENCES, E.P. e FRY, S.C. Sequencing of xyloglucan oligosaccharides by partial driselase digestion: The preparation and quantitative and qualitative analysis of two new tetrasaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 263, p. 285-293, 1994.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Lortenzi, .p 155, Ed. Plantarum, Nova Odessa, SP,
- MACLACHLAN, G., LEVY, B. e FARKAS, V. Acceptor requirements for GDP-fucose 1,2- $\alpha$ -L-fucosyltransferase activity solubilized from pea epicotyl membranes. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 294, nº. 1, p. 200-205, 1992.
- McDOUGALL, G.J. e FRY, S.C. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. **Plant Physiol.**, v. 93, p. 1042-1048, 1990.
- McDOUGALL, G.J. e FRY, S.C. Anti-auxin activity of xyloglucan oligosaccharides: the role of groups other than the terminal  $\alpha$ -L-fucose residue. **J. Exp. Bot.**, v. 40, nº. 211, p. 233-238, 1989.
- McDOUGALL, G.J. e FRY, S.C. Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. **Planta**, v. 175, p. 412-416, 1988.

- McDOUGALL, G.J. e FRY, S.C. Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. **Plant Physiol.**, v. 89, p. 883-887, 1989.
- McDOUGALL, G.J. e FRY, S.C. Purification and analysis of growth-regulating xyloglucan-derived oligosaccharides by high-pressure liquid chromatography. **Carbohydr. Res.**, v. 219, p. 123-132, 1991.
- McGURL, B., PEARCE, G., OROZCO-CALDENAS, M. e RYAN, C.A. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. **Science**, v. 255, p. 1570-1573,
- McNEIL, M., DARVILL, A.G., FRY, S.C. e ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell wall of plants. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 625-663, 1984.
- McQUEEN-MASON, S.J.; DURACHKO, D.M. e COSGROVE, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **Plant Cell**, v. 4, p. 1425-1433, 1992.
- McQUEEN-MASON, S.J., FRY, S.C., DURACHKO, D.M. e COSGROVE, D.J. The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. **Planta**, v. 190, p. 327-331, 1993.
- MOON, A.M., DYER, M.I., BROWN, M.R. e CROSSLEY, D.A. Epidermal growth factor interacts with indole-3-acetic acid and promotes coleoptile growth. **Plant Cell Physiol.**; v. 35, nº. 8, p. 1173-1177, 1994.
- NEF-CAMPA, C., TROUSLOT, M.-F., TROUSLOT, P. e CHRESTIN, H. Long-term effect of a *Pythium* elicitor treatment on the growth and alkaloid production of *Catharantus roseus* cell suspensions. **Plant Med.**, v. 60, p. 149-152, 1994.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method from the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 153, p. 375-380, 1944.

- NISHITANI, K. e TOMINAGA, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of xyloglycan molecule to another xyloglucan molecule. **J. Biol. Chem.**, v. 267, nº. 29, p. 21058-21064, 1992.
- OHMIYA, Y., TAKEDA, T., NAKAMURA, S., SAKAI, F. e HAYASHI, T. Purification and properties of a wall-bound endo-1,4- $\beta$ -glucanase from suspension-cultured poplar cells. **Plant Cell Physiol.**, v. 36, nº. 4, p. 607-614, 1995.
- OHSUMI, C. e HAYASHI, T. The oligosaccharide units of the xyloglucans in the cell walls of bulbs of onion, garlic and their hybrid. **Plant Cell Physiol.**, v. 35, nº. 6, p. 963-967, 1994.
- PASCHOLATI, S.F. e LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. Bergamin-Filho, A., Kimato, H. e Amorim, L., cap. 22. In. **Manual de Fitopatologia**. v. 1, Princípios e conceitos. Agronômica ceres, 1995, São Paulo.
- PASCHOLATI, S.F. e LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. Cruz, W.C.D., In. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, Passo fundo, 1994.
- PAVLOVA, Z.N., ASH, A.O., VNUCHKOVA, V.A., BABAKOV, A.V., TORGOV, V.I., NECHAEV, O.A., USOV, A.I. e SHIBAEV, V.N. Biological activity of a synthetic pentasaccharide fragment of xyloglucan. **Plant Sci.**, v. 85, p. 131-134, 1992.
- PAYRE, N., COTTAZ, S. e DRIGUEZ, H. Chemoenzymatic synthesis of a modified pentasaccharide as a specific substrate for a sensitive assay of  $\alpha$ -amylase by fluorescence quenching. **Angew. Chem. Int.**, v. 34, nº. 11, 1995.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S. e RYAN, C.A. Apolypeptide from tomato leaves induced wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v. 253, p. 895-898, 1991.

- POTTER, I. e FRY, S.C. Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormone-induced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach cell suspension cultures. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 1703-1710, 1994.
- POTTER, I. e FRY, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes effects of applied gibberellic acid. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 235-241, 1993.
- PRESTON, R.D. **The physical biology of plant cell walls**. London: Chapman e Hall, 1974.
- PRESTON, R.D. The case for multinet growth in growing walls of plant cells. **Planta**, v. 155, p. 356-363, 1982.
- RASKIN, I. Salicylate, a new plant hormone. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 799-803, 1992.
- RENARD, C.M.G.C., LOMAX, J.A. e BOON, J.J. Apple-fruit xyloglucans: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and of alkali-extracted xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, v. 232, p. 303-320, 1992.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira**. Edgard Blucher, São Paulo, p. 124-128, 1978.
- ROCO, A., CASTAÑEDA, P. e PÉREZ, L.M. Oligosaccharides released by pectinase treatment of *Citrus limon* seedlings are elicitors of the plant response. **Phytochemistry**, v. 33, nº. 6, p. 1301-1306, 1993.
- RODRIGUEZ-GÁLVEZ, E. e MENDGEN, K. Cell wall synthesis in cotton roots after infection with *Fusarium oxysporum*. **Planta**, v. 197, p. 535-545, 1995.
- ROELONFSEN, P.A. e HOUWINK, A.L. Architecture and growth of the primary cell wall in some plant hairs and in the *Phycomyces sporangiophora* **Acta Bot. Neerl.**, v. 2, p. 218-225, 1953.

- ROSE, J.K.C., BRUMMELL, D.A. e BENNETT, A.B. Two divergent xyloglucan endotransglycosylases exhibit mutually exclusive patterns of expression in nasturtium. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 493-499, 1996.
- ROY, R., KATZENELLENBAGEN, E. e JENNINGS, H. Improved procedure for the conjugation of oligosaccharides to protein by reductive amination. **Can. J. Biochem.Cell. Biol.**, v. 62, p. 270-275, 1984.
- RYAN, C.A. Oligosaccharide signals: from plant defense to parasite offense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 1-2, 1994.
- SCHULTZE, M., QUICLET-SIRE, B. KONDOROSI, E., VIRELIZIER, H., GLUSHKA, J.N., ENDRE, G., GERO, S.D. e KONDOROSI, A. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plants host specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 89, p. 192-196, 1992.
- SEMBDENER, G. ATZORN, R. e SCHNEIDER, G. Plant hormone conjugation. **Plant Mol. Biol.**, v. 26, n°. 5, p. 1459-1481, 1994.
- SHARP, J.K., VALENT, B. e ALBERSHEIM, P. Purification and partial characterization of a  $\beta$ -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 11312-11320, 1984.
- SHIBUYA, N., KAKU, H., KUCHITSU, K. e MALIARLK, M.J. Identification of a novel binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultures rice cells. **FEBS Lett.**, v. 329, p. 75-78, 1993.
- SHIMIZU, Y., AOTSUKA, S., HASEGAWA, O., KAWADA, T., SAKUNO, T., SAKAI, F. e HAYASHI, T. Changes in levels of mRNAs, for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cells. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, n°. 3, p. 375-378, 1997.

- SIDDIQUI, R. e WOOD, P.J. Structural investigation of sodium hydroxide-soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 53, p. 85-94, 1977.
- SIMS, I.M., MUNRO, S.L.A., CURRIE, G., CRAIK, D. e BACIC, A. Structural characterisation of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydr. Res.**, v. 293, p. 147-172, 1996.
- SMITH, R.C. e FRY, S.C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. **Biochem. J.**, v. 279, p. 529-535, 1991.
- SNYDER, B.A. e NICHOLSON, R.L. Synthesis of phytoalexins in sorghum as site-specific response to fungal ingress. **Science**, v. 248, p. 1585-1688, 1990.
- SNYDER, B.A., LEITE, B., HIPSKIND, J. e NICHOLSON, R.L. Accumulation of sorghum phytoalexins induced by *Colletotrichum graminicola* at the infection site. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, v. 39, p. 463-470, 1991.
- SOMOGY, M.A. New reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- SONE, Y. e SATO, K. Measurement of oligosaccharides derived from tamarind xyloglucan by competitive ELISA assay. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, nº. 12, p. 2295-2296, 1994.
- SOUZA-LIMA, M.M. **Polissacarídeos nativos e modificados das sementes de *Hymenaea courbaril***. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 1997.
- SPAINK, H.P., SHEELY, D.M., VAN BRUSSEL, A.A.N., GLUSHKA, J., YORK, W.S., TAK, T., GEIGER, O., KENNEDY, E.P., REINHOLD, V.N. e LUGTENBERG, B.J.J. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. **Nature**, v. 354, p. 125-130, 1991.

- STASWICK, P.E. Jasmonate, genes, and fragment signals. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 804-807, 1992.
- STAUB, A.M. Removal of proteins. Sevag method. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 5-6, 1965.
- SULOVA, Z., LEDNICKA, M. e FARKAS, V. A colorimetric assay for xyloglucan-endotransglycosylase from germinating seeds. **Anal. Biochem.**, v. 229, p. 80-85, 1995.
- TAIZ, L. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. **Ann. Ver. Plant Physiol.**, v. 35, p. 585-657, 1984.
- TALBOTT, L.D. e PICKARD, B.G. Differential changes in size distribution of xyloglucan in the cell walls of gravitropically responding *Pisum sativum* epicotyls. **Plant Physiol.**, v. 106, p. 755-761, 1994.
- TREVELYAN, W.E., PROTER, D.P. e HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.
- TRUCHET, G., ROCHE, P., LEROUGE, P., VASSE, J., CAMUT, S., DeBILLY, F., PROMÉ, J.-C. e DENARIE, J. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* root nodule organogenesis in alfafa. **Nature**, v. 351, p. 670-673, 1991.
- TSANG, V.V.W., WILSON, B.C. e PERALTA, J.M. Quantitative single-tube, kinetic-dependent enzyme-linked immunoassay (K-Elisa). Langone J.J. e Van Vunakis, H. eds. In: **Methods in Enzymology** Academic Press, London, v. 92, p. 391-413, 1983.
- UMEMOTO, N., KARITANI, M., IWAMATSU, A., YOSHIKAWA, M. YAMAOKA, N. e ISHIDA, I. The structure and function of a soybean  $\beta$ -glucan-elicitor-binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 1029-1034, 1997.

- VALENT, B.S. e ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. **Plant Physiol.**, v. 54, p. 105-108, 1974.
- VELUPILLAI, P. e HARN, D.A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+T-cell subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, nº. 1, p. 18-22, 1994.
- VINCKEN, J.-P., KEIZER, A., BELDMAN, G. e VORAGEN, A.G.J. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 1579-1585, 1995.
- VINCKEN, J.P., WIJSMAN, A.J.M., BELDMAN G., NIESSEN W.M.A. e VORAGEN, A.G.J. Potato xyloglucan is built from XXGG-type subunits. **Carbohydr. Res.**, v. 288, p. 219-232, 1996.
- VINCKEN, J.P., YORK, W.S., BELDMAN G. e VORAGEN, A.G.J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 9-13, 1997.
- WANG, Q., ELLIS, P.R., ROSS-MURPHY, S.B. e REID, J.S.G. A new polysaccharide from a traditional Nigerian plant food: *Detarium senegalense* Gmelin. **Carbohydr. Res.**, v. 284, p. 229-239, 1996.
- WARNECK, H. e SEITZ, A. Inhibition of gibberellic acid-induced elongation growth of pea epicotyls by xyloglucan oligosaccharides. **J. Exp. Bot.**, v. 44, p. 1105-1109, 1993.
- WESSELS, J.G.H. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. **Int. Rev. Cytol.**, v. 104, p. 37-79, 1986.
- WHITE, A.R., XIN, Y. e PERESHK, V. Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea). **Biochem. J.**, v. 294, p. 231-238, 1993.

- WOLFROM, M.L. e THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963.
- WU, Y., SPOLLEN, W.G., SHARP, R.E., HETHERINGTON, P.R. e FRY, S.C. Root growth maintenance at low water potentials. **Plant Physiol.**, v. 106, p. 607- 615, 1994.
- XU, W., PURUGGANAN, M.M., POLISENSKY, D.H., ANTOSIEWICZ, D.U., FRY, S.C. e BRAAM, J. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. **Plant Cell**, v. 7, p. 1555-1567, 1995.
- YANG, T., DAVIES, P.J. e REID, J.B. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 1029-1034, 1996.
- YORK, W.S., DARVILL, A.G. e ALBERSHEIM, P. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 295-297, 1984.
- YORK, W.S., HARVEY, L.K., GUILLEN, R., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A.G. Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, v. 248, p. 285-301, 1993.
- YORK, W.S., IMPALLOMENI, G., HISAMATSU, M., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A.G. Eleven newly characterized xyloglucan oligoglycosyl alditols: the specific effects of side chain structure and location on  $^1\text{H-NMR}$  chemical shifts. **Carbohydr. Res.**, v. 267, p. 79-104, 1995.
- YORK, W.S., VAN HALBEEK, H., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A.G. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, v. 200, p. 9-31, 1990.

- YORK, W.S., KUMAR-KOLLI, V.S., ORLANDO, R., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A.G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydr. Res.**, v. 285, p. 99-128, 1996.
- YOSHIKAWA, K., YAMAMOTO, K. e OKADA, S. Isolation of *Aspergillus flavus* MO-5 producing two types of intracellular  $\alpha$ -D-xylosidases: purification and characterization of  $\alpha$ -D-xylosidases I. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, n<sup>o</sup>. 8, p. 1275-1280, 1993.
- YOSHIKAWA, K., YAMAMOTO, K. e OKADA, S. Purification and characterization of an intracellular  $\alpha$ -D-xylosidase II from *Aspergillus flavus* MO-5. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, n<sup>o</sup>. 8, p. 1281-1285, 1993.
- ZABLACKIS, E., YORK, W.S., PAULY, M., HANTUS, S., REITER, W-D., CHAPPLE, C.C.S., ALBERSHEIM, P. e DARVILL, A. Substitution of L-fucose by L-galactose in cell wall of *Arabidopsis mur1*. **Science**, v. 272, p. 1808-1810, 1996.
- ZABLACKIS, E., HUANG, J., MÜLLER, B., DARVILL, A.G. e ALBERSHEIM, P. Characterization of the cell-wall polyccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1129-1138, 1995.
- ZAZÍMALOVÁ, E.; OPATRNÝ, Z., BREZINOVA, A. e EDER, J. The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content. **J. Exp. Bot.**, v. 46, n<sup>o</sup>. 290, p. 1205-1213, 1995.
- ZHANG, G.F. e STAEHELIN, K.A. Functional compartment of the Golgi apparatus of plant cells. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 1070-1083, 1992.

**ANEXO 1**

#### TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS:

RECHIA, C.G.V.; DRIGUEZ, H.; HEYRAUD, A.; SIERAKOWSKI, M.R.; REICHER, F.  
Isolation and structural analysis from xyloglucan oligosaccharides derived of endosperm from *Hymenaea courbaril*. In: Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Bioquímica, XXV, Caxambú-MG, 1996.

VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; GAUTIER, C.; DRIGUEZ, H.; LIENART, Y. Oligosaccharide from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* as signalling molecule. In: Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Bioquímica, XXVI, Caxambú-MG, 1997.

#### TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS:

RECHIA, C.G.V.; HEYRAUD, A.; GEY, C.; REICHER, F.; DRIGUEZ, H.; COLIN-MOREL, P. Purification par perméation de gel et HPLC d'oligosaccharides de xyloglucanes isolés de l'endosperme de *Hymenaea courbaril*. 14<sup>ème</sup> Colloque National de Chromatographie d'exclusion Stérique et 7<sup>ème</sup> Journée de Biochromatographie, Grenoble, França, 1996.

RECHIA, C.G.V.; HEYRAUD, A.; REICHER, F.; DRIGUEZ, H.; SIERAKOWSKI, M.R.; LIENART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as signaling molecule. 3<sup>ème</sup> Colloque General de la Societé Française de Physiologie Végétale, Toulouse, França, 1997.

#### ARTIGOS PUBLICADOS:

LIMA, N.N.; RECHIA, C.G.V.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. AND SIERAKOWSKI, M.R. Oligosaccharides from de seeds of *H. courbaril*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n°. 6, p. 409-412, 1995.

VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIENART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as signaling molecule, **Plant. Physiol.**, v. 116, nº. 3, p. 1013-1021, 1998.

ARTIGO EM PREPARAÇÃO:

VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; DRIGUEZ, H.; LIENART, Y. Induction of glycohydrolase activities in *Rubus* protoplasts by xyloglucan oligosaccharides from *H. courbaril* seeds.

# Xyloglucan Octasaccharide XXLGol Derived from the Seeds of *Hymenaea courbaril* Acts as a Signaling Molecule<sup>1</sup>

Carem Vargas-Rechia<sup>2</sup>, Fany Reicher, Maria Rita Sierakowski, Alain Heyraud, Hugues Driguez, and Yvette Liénart\*

Department of Biochemistry, Universidad Federal do Paraná, BP 19046, 81531–970, Curitiba, Paraná, Brazil (F.R.); Department of Chemistry, Universidad Federal do Paraná, BP 19081, 81531–990, Curitiba, Paraná, Brazil (M.R.S.); and Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales-Centre National de la Recherche Scientifique, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France (affiliated with the Joseph Fourier University, Grenoble; C.V.-R., A.H., H.D., Y.L.)

Treatment of the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* with *Humicola insolens* endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase I produced xyloglucan oligosaccharides, which were then isolated and characterized. The two most abundant compounds were the heptasaccharide (XXXG) and the octasaccharide (XXLG), which were examined by reference to the biological activity of other structurally related xyloglucan compounds. The reduced oligomer (XXLGol) was shown to promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) coleoptiles independently of the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In the presence of 2,4-D, XXLGol at nanomolar concentrations increased the auxin-induced response. It was found that XXLGol is a signaling molecule, since it has the ability to induce, at nanomolar concentrations, a rapid increase in an  $\alpha$ -L-fucosidase response in suspended cells or protoplasts of *Rubus fruticosus* L. and to modulate 2,4-D or gibberellic acid-induced  $\alpha$ -L-fucosidase.

Xyloglucan is a major hemicellulosic polysaccharide in the primary cell walls of dicotyledons and nongraminaceous monocotyledons and is also present as a storage polysaccharide in the seeds of many dicotyledons (McNeil et al., 1984; Reid, 1985; Lima et al., 1993; York et al., 1993; Braccini et al., 1995). The heterogeneity of xyloglucans results from differences in their molecular mass, distribution, and levels of substituted xylosyl units with galactosyl and fucosyl residues. Thus, the fucosyl residue has been found to be (1 $\rightarrow$ 2)-linked to the  $\beta$ -galactosyl residue in suspended cells of *Rosa* sp. (McDougall and Fry, 1988) and sycamore (Stephen, 1983) or when xyloglucans were isolated from the stems and the roots of etiolated pea (*Pisum sativum* L.) plants (Guillén et al., 1995). This residue is unusual in seed xyloglucans (Siddiqui and Wood, 1977; Guidley et al., 1991).

The metabolism of xyloglucans in cellulose microfibril networks is important for cell wall expansion. Support for this idea comes from alterations to xyloglucan that contribute to wall extensibility. Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, xyloglucanase,  $\alpha$ -L-fucosidase, and/or endo-type transferases such as xyloglucan endotransglycosylase are involved in the auxin- or acid-promoted breakdown of xyloglucans (Hayashi et al., 1984; Hetherington and Fry, 1993). Furthermore, xyloglucan-derived oligomers exhibited signaling effects. The Fuc-rich xyloglucan from suspension cultures of *Rosa* sp. digested by *Trichoderma viride* cellulase resulted in the formation of a nonasaccharide-containing terminal fucosyl residue (XXFG; Fry et al., 1993a). This oligosaccharide acts as an anti-auxin 2,4-D growth promotor in etiolated pea stems (McDougall and Fry, 1988) and was also able to inhibit GA<sub>3</sub> induction of pea segments (Yang et al., 1996), stimulate glycan-synthase activities, and increase the viability of protoplasts (Emmerling and Seitz, 1990). Substitution of the XXXG core with one or two Gal residues to give XXLG and XLLG resulted in growth promotion and in the *in vitro* stimulation of cellulase (McDougall and Fry, 1990).

*Hymenaea courbaril* (Leguminosae) is a species that occurs abundantly throughout Brazilian forests from the northeast to the south, and the seeds contain 40 to 45% xyloglucan, the structure of which consists of a cellulosic-type (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\beta$ -D-glucan main chain and side chains containing  $\alpha$ -D-xylopyranosyl and  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-xylopyranosyl residues, each (1 $\rightarrow$ 6)-linked to the main chain (Lima et al., 1993, 1995). Here, the ability of endoglucanase I of *Humicola insolens* to cleave the (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\beta$ -D-glucosyl residues of xyloglucan from *H. courbaril* seeds was carried out. The released oligomers (such as XXLG and XXXG) were then examined under the reduced form in terms of their biological activity with other structurally related xyloglucan compounds. The auxin activity of XXLGol *in vivo* was investigated using wheat coleoptiles. Parallel to this, a system of *Rubus fruticosus* L. protoplasts was

<sup>1</sup> Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

<sup>2</sup> Permanent address: Department of Chemistry and Physical, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 14040–903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

\* Corresponding author; e-mail liénart@cermav.cnrs.fr; fax 33-4-76-54-72-03.

Abbreviations: DP, degree of polymerization; FAB, fast-atom bombardment; XXXG, XXLG, and XXFG, the xyloglucan-derived hepta-, octa-, and nonasaccharide, respectively (see Fry et al., 1993b); XXXGol, XXLGol, and XXFGol, the reduced oligomers of XXXG, XXLG, and XXFG, respectively.

used to study the signaling effect of the induction of  $\alpha$ -L-fucosidase activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

The *Humicola insolens* endoglucanase I (121 endocellulase units  $\text{mg}^{-1}$ ) was a gift of Dr. Schülein (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) and was obtained as described by Armand et al. (1997). Caylase 345 (cellulase) and Caylase M3 (pectinase) were purchased from Cayla (Toulouse, France).  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glc (2'-fucosyl-lactose) was from Oxford GlycoSystems (Coger, Paris, France). XXFGol, prepared from *Rubus fruticosus* L. suspended cells as described by Joseleau et al. (1992), was a gift of Dr. Gérard Chambat (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales-Centre National de la Recherche Scientifique, Grenoble, France). The trisaccharide methyl  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl side chain of the xyloglucan molecule was prepared as described by Lopez et al. (1994) and was a gift of Dr. Fernandez-Mayoralas (Instituto de Química Orgánica General, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain). The oligogalacturonides of DP ranging from 12 to 15 and maltopentaose were a gift of Dr. Alain Heyraud (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales-Centre National de la Recherche Scientifique). Potassium benzyl penicillin, cycloheximide, actinomycin D, and *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -L-fucopyranoside were from Sigma. BioGel-P2 was from Bio-Rad.

### Materials

Suspensions of *R. fruticosus* L. cultures, originally derived from cambial explants from twigs, were grown as described by Hustache et al. (1975). *Hymenaea courbaril* seeds were collected in July 1995, at the campus of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. Seeds of wheat (*Triticum aestivum* var Festival) were purchased from EARL Benoist (Airvault, France).

### Preparation of XXXGol and XXLGol

Preparation of XXXGol and XXLGol was as follows: Purified xyloglucan from *H. courbaril* seeds was obtained according to the method of Lima et al. (1995). A sample (500 mg) was incubated (96 h, 37°C) in water (100 mL) containing endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase type I (5 mg) from *H. insolens* (EC 3.2.1.4; 121 endocellulase units/mg). Aliquots (0.25 mL) were removed from the incubated sample at 0, 24, 48, 72, and 96 h, and the reducing sugars were determined. The enzymatic reaction was stopped by heating at 100°C for 5 min, insoluble material was removed by centrifugation, and the supernatant was concentrated and lyophilized. Aliquots of the oligosaccharide mixture (50 mg, 1 mL) were filtered on a cellulose nitrate membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ) and applied to a column (1.5  $\times$  210 cm; 60°C) of BioGel-P2 (400 mesh). Elution with water was at a flow rate of 0.5 mL  $\text{min}^{-1}$ , controlled by a peristaltic pump (Milton-

Roy, Rochester, NY). Eluted oligosaccharides were monitored with a differential refractometer (model R403, Waters).

Oligosaccharides were reduced as described by York et al. (1993): they were first dissolved (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) in water containing  $\text{NaBH}_4$  (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ; 3 h). Excess of borohydride was decomposed with glacial acetic acid, and residual borate was removed by coevaporation with methanol. The resulting oligoglycosyl alditols (5 mg per injection) were filtered on a cellulose nitrate membrane (0.3  $\mu\text{m}$ ), desalted, and separated by reverse-phase chromatography on a Nucleosil C-18 semipreparative column (25  $\times$  0.46 cm) eluted with 7% aqueous methanol as the mobile phase at a flow rate of 2 mL  $\text{min}^{-1}$ ; eluted oligosaccharides were detected by monitoring the refractive index.

### NMR Spectroscopy

NMR spectra were recorded with a spectrometer (model AC300, Bruker, Billerica, MA). The alditol samples were dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$  (2 mg  $\text{mL}^{-1}$  [ $^1\text{H}$ ] and 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  [ $^{13}\text{C}$ ]). Chemical shifts are reported as  $\delta$  relative to internal acetone as  $\delta$  2.04 ( $^1\text{H}$ ) and 29.8 ( $^{13}\text{C}$ ) with respect to the signals for tetramethylsilane at 333 K ( $^1\text{H}$ ) and 303 K ( $^{13}\text{C}$ ).

### FAB-MS Spectrometry

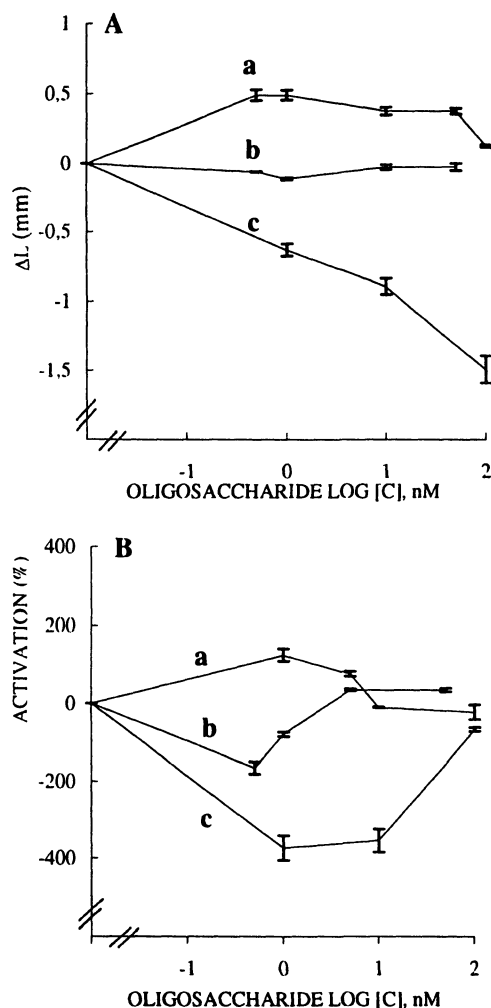
Low-mass resolution measurements were performed on a quadripole mass spectrometer (model R.10.10C, Nermag, Rueil-Malmaison, France) using a glycerol matrix and FAB(+) mode.

### Wheat Coleoptile Growth Bioassays

Seeds were grown in the dark and 3-d-old wheat seedlings with the first internode measuring 15 mm were selected. These samples were incubated in sterile, plastic Petri dishes (15–20 seeds per dish) in two independent replicate sets containing 15 mL of fresh medium (1% [w/v] Suc, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , [pH 6.1] and 0.02% potassium benzyl penicillin) with or without effector. The bioassay was started by the addition of 2,4-D (1  $\mu\text{M}$ ) and/or XXLGol (0.5, 1, 10, 50, and 100 nM), XXFGol (0.5, 1, 10, and 50 nM), 2'-fucosyl-lactose (1, 10, and 100 nM), and the coleoptile length was measured at intervals up to 62 h. Controls were concomitantly run in the described medium without the addition of 2,4-D or oligosaccharide. The variability in elongation of the 15 to 20 stem segments in a single dish was measured with a Student's *t* test, and data with  $P < 0.05$  were analyzed. Data points of kinetic curves are each means  $\pm$  SE of 30 to 40 determinations (Fig. 1).

### Preparation of Cells and Protoplasts from *R. fruticosus* L.

Cells in the exponential growth phase (15–18 d after subculturing) were collected by centrifugation at 4000g for 5 min, washed with Heller's medium, and resuspended in 50 mM sodium-citrate buffer, pH 5.9, containing 2% Suc, 4 mM EGTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 0.06 mM  $\text{CaCl}_2$ . For protoplast isolation, 18- to 20-d-old cells (40 g fresh weight) were incubated overnight at room temperature in 300 mL of the



**Figure 1.** Effect of the xyloglucan oligomers XXLGol (a) and XXFGol (b) and of 2'-fucosyl-lactose (c) on the straight growth of wheat coleoptiles (A) and on the elongation promoted by 2,4-D (B). Two independent experiments, each conducted from 15 to 20 coleoptile segments treated or not with 2,4-D (1  $\mu\text{M}$ ) for 62 h were monitored and the mean increments of length ( $\Delta\text{L}$ ) were plotted. In A each value of a curve is the average of 30 to 40 experiments, and vertical bars represent SEs. Data are presented as  $\Delta\text{L}$  versus log sugar concentration;  $\Delta\text{L}$  is the additional increase in length between 10 and 20 h. The absolute increase in length of controls (sets in the absence of 2,4-D or oligosaccharides) exhibited the mean value of 3.87 mm. This value was the reference ( $\Delta\text{L} = 0$ ). In B data are presented as mean percentages of inhibition or activation of 2,4-D-stimulated growth, calculated as percentages of activation or inhibition =  $(L_{(2,4-D + \text{oligosaccharide})} - (L_{(2,4-D)} / (L_{(2,4-D)} - L_{(\text{control})}) - L_{(\text{control})}) \times 100\%$ , where  $L_{(2,4-D)}$  is the mean final length of segments treated with 2,4-D,  $L_{(\text{control})}$  is the mean final length of segments incubated without 2,4-D, and  $L_{(2,4-D + \text{oligosaccharide})}$  is the mean final length of segments treated with 2,4-D plus the oligosaccharide. Plotted data represent the means  $\pm$  SE.

growth medium, pH 5.9, supplemented with 0.56 M mannitol and 0.25% (w/v) cellulase and 0.01% (w/v) pectinase. The released protoplasts were filtered through a 100- $\mu\text{m}$  nylon mesh washed twice with the incubation medium with no cell wall-degrading enzymes before being pelleted at 500g for 5 min. They were resuspended in 25 mM Bis-Tris-HCl buffer, pH 4.8, containing 0.56 M mannitol, 0.06 M Suc, 1 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 6% (w/v) Ficoll 400, and

were then centrifuged at 500g for 5 min, and finally washed with Bis-Tris-HCl buffer without Ficoll. Protoplast yields ranged from 70 to 85% of the initial number of treated cells.

### Bioassays

Protoplasts ( $2 \times 10^6$  or cells) of *R. fruticosus* were suspended under stirring in 25 mL of buffer (25 mM Bis-Tris-HCl, pH 4.8, containing 0.56 M mannitol, 0.06 M Suc, 1 mM KCl, and 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) in the presence or absence of: oligo-, polysaccharide inducer up to 100 nM; 2,4-D or  $\text{GA}_3$  (10 nM); cycloheximide (1  $\mu\text{M}$ ); or actinomycin D (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The concentration of oligomers is expressed as molarity, and the molar concentration of the polymer is reported by reference to XXLG repeating units. Protoplasts (or cells) were harvested at various intervals by centrifugation at 300g for 8 min at 4°C, before being subjected to enzyme extraction. The viability of protoplasts was controlled using Evan's blue indicator.

### $\alpha$ -L-Fucosidase Assays

Enzymes were extracted in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, containing 1 M NaCl by homogenizing the protoplasts on ice with a polytron at full speed, 15 times for 45 s. The extracts were dialyzed and concentrated using ultrafiltration units equipped with a molecular mass cutoff value of a 10-kD membrane (Ultrafree, Millipore, Bedford, MA).  $\alpha$ -L-Fucosidase (EC 3.2.1.51) was assayed as follows: *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -L-fucopyranoside (2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) was incubated at 40°C for 0 to 90 min with crude enzyme extract (1  $\mu\text{g}$  of protein based on colorimetric determination; Bradford, 1976) in 200  $\mu\text{L}$  of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. The enzyme reaction was quenched with 100  $\mu\text{L}$  of 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and  $\alpha$ -L-fucosidase activity was determined by measuring the  $A_{410}$  of the *p*-nitrophenolate ion according to the method of Lee and Zeikus (1993).

For each oligosaccharide tested, enzyme assays were performed from three to four replications from three independent elicitation sets, and kinetic curves were drawn and fitted with the second-order polynomial regressions. The velocity of enzyme activities was calculated from regression equations using Excel software, and enzyme activation is expressed as  $R$ , which is the ratio of the slopes of the fitted curves obtained from treated protoplasts versus controls. The treated protoplasts were elicited by one oligosaccharide and/or one hormone. The controls were the protoplasts suspended in buffer without any effector. Blanks (without enzyme or without substrate) were carried out for each sample.

## RESULTS

### Preparation and Characterization of Oligosaccharides Derived from Xyloglucan of *H. courbaril* Seeds

The enzymatic hydrolysis of the xyloglucan isolated from *H. courbaril* seeds was carried out using endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase I from *H. insolens* (Armand et al., 1997). The water-soluble oligosaccharides (450 mg) were partially

fractionated according to their molecular weights by BioGel-P2 chromatography. Higher-molecular-weight oligosaccharide components represented 50% of eluted material and were not analyzed further. Fractions corresponding to oligomers of DP 5 to 8 were pooled and converted to their corresponding alditol derivatives. The mixture was further fractionated by reverse-phase chromatography. Only the two major oligosaccharides (4 and 42 mg), with retention times of 35 and 41.26 min, respectively, were isolated and characterized.

The oligosaccharides were identified by their  $^1\text{H-NMR}$  spectra as XXXGol and XXLGol. The shape and chemical shift of their  $^1\text{H-NMR}$  signals were in agreement with those already published (York et al., 1993), considering the differences in experimental conditions. Our NMR spectra were recorded on a spectrometer (model AC300, Bruker, Wissembourg, France) at 333 K at a concentration of 10 to 20 mg mL $^{-1}$ ; York et al. (1993) used a Bruker 500 at 298 K and a concentration of 1 to 10 mg mL $^{-1}$ . In the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of XXLGol, H-1 signals of  $\alpha\text{-Xylp}$  units were a doublet ( $\delta$  5.03, J 4.0 Hz) and a triplet of two superimposed signals centered at  $\delta$  4.81, each with J 4.0 Hz. The H-1 signal of the  $\beta\text{-Galp}$  unit was detected as a doublet ( $\delta$  4.50, J 10 Hz). The H-1 signal of the  $\beta\text{-Glc}$  gave a broad doublet ( $\delta$  4.40, J 8 Hz, 3 units).

The  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of the octasaccharide XXLGol was consistent with the structure (York et al., 1993; Guillén et al., 1995), with C-1 signals at  $\delta$  105.5 ( $\beta\text{-Galp}$ ); 103.8, 103.6, and 103.3 (each  $\beta\text{-Glc}$ ); 99.9 ( $2 \times \alpha\text{-Xylp}$ ) and 99.3 ( $\alpha\text{-Xylp}$ ); and  $\beta\text{-Glc}$  4-O-substituted resonances at  $\delta$  70.5, 80.3, 80.7, and 80.9. Its positive-ion FAB-MS indicated a molecular weight at 1226 (i.e.  $\text{GalXyl}_3\text{Glc}_3\text{Gol}$ ;  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  1227;  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  at  $m/z$  1249). Because of the rupture of glycosidic linkages, the ions at  $m/z$  1085, 1065, 983, 791, and 645 were also assigned.

XXXGol was also characterized on the basis of its  $^1\text{H-NMR}$  and FAB-MS (Guillén et al., 1995). The H-1 region has neither the signal at  $\delta$  5.0, which corresponds to Xyl substituted at O-2 by Gal, nor that of  $\beta\text{-Galp}$ . Its positive-ion FAB-MS indicated a molecular weight at 1064 (i.e.  $\text{Xyl}_3\text{Glc}_3\text{Gol}$ ;  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  at  $m/z$  1087).

### Growth Induction by Xyloglucan Oligosaccharides and 2'-Fucosyl-Lactose

The coleoptiles incubated in Petri dishes showed no significant variability in elongation. Therefore, all of the samples subjected to a particular treatment on a given day were viewed as a single population, despite the fact that they were distributed between distinct dishes. The ability of the xyloglucan oligosaccharides XXLGol and XXFGol and of 2'-fucosyl-lactose to interact with coleoptile growth, induced or not with 2,4-D, were bioassayed during 62 h. The oligosaccharides were used here at the narrow nanomolar concentration range up to 100 nM, which can promote enzyme-activation responses as detailed below. The trisaccharide was chosen to test the importance of Xyl in the activity by reference to the 2'-fucosyl-lactose. The growth rates between 10 and 20 h of incubation were first investigated as a function of experimental time (not shown)

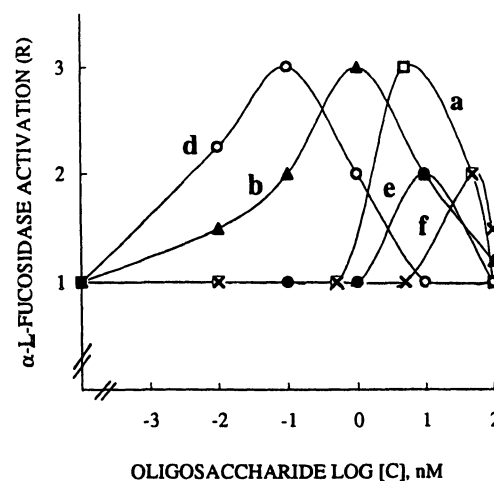
and then expressed as  $\Delta L$  versus log sugar concentration (Fig. 1A) or as a percentage of growth promotion (percentage of activation) or growth inhibition (percentage of inhibition) by 2,4-D (Fig. 1B).

The results without 2,4-D (Fig. 1A) clearly indicate that XXLGol at a concentration ranging from 0.5 to 100 nM exhibited growth stimulation (curve a), that XXFGol was not active (curve b), and that 2'-fucosyl-lactose showed an inhibiting effect (curve c). In the presence of 2,4-D used at 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 1B), XXLGol increased the auxin-induced response (curve a), whereas XXFGol (curve b) and 2'-fucosyl-lactose (curve c) showed anti-auxin activity. It was observed that XXFGol, which was less active than 2'-fucosyl-lactose, had anti-auxin activity at low concentrations but exhibited growth-restoring activity at high concentrations.

### Xyloglucosyl Oligomers as Inducers of $\alpha\text{-L-Fucosidase}$ Activity

*R. fruticosus* protoplasts were incubated for 15 min in the presence of sugar inducers at concentrations up to 100 nM. The inducers were the xyloglucan polymer from *H. courbaril* seeds (Lima et al., 1995), the derived oligosaccharides XXLGol, XXXGol, and XXFGol obtained from *R. fruticosus* xyloglucan, and the trisaccharide methyl  $\alpha\text{-L-Fuc}(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Xyl}$ . It was verified that protoplast viability was not affected by the treatment and remained identical to the control protoplasts (90%) throughout the experiments.

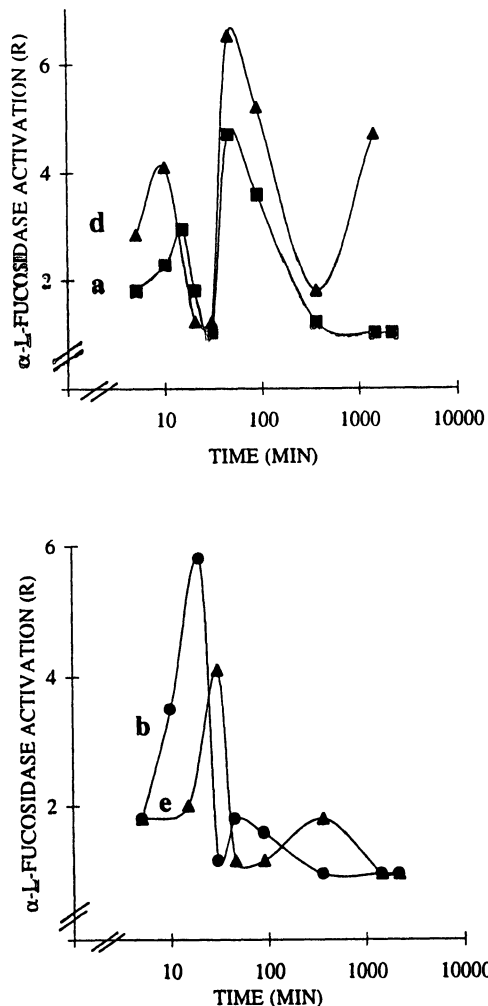
Dose-response curves for  $\alpha\text{-L-fucosidase}$  activation are shown in Figure 2. With all of the inducers used up to 100 nM, e.g. the oligomers XXLGol, XXFGol, and XXXGol (curves a, b, and d, respectively), the trisaccharide (curve e), and the xyloglucan polymer (curve f), bell-shaped



**Figure 2.** Dose-response curves for  $\alpha\text{-L-fucosidase}$  response induced by the xyloglucan oligomers XXLGol (a), XXFGol (b), and XXXGol (d), the trisaccharide methyl  $\alpha\text{-L-Fuc}(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Xyl}$  (e), and the polymer (f). *R. fruticosus* protoplasts ( $2 \times 10^6$ ) in 25 mL of buffer were incubated for 15 min in the presence of inducer up to 100 nM. Each curve was obtained by least-squares regression of data from three to four replications carried out from three independent inducer sets.  $R$  is reported as the rate of  $\alpha\text{-L-fucosidase}$  activity of treated over control protoplasts.

curves were obtained. The highest activities, with maximum  $R$  values of approximately 3, were observed for XXXGol, XXFGol, and XXLGol at 0.1, 1, and 5 nM, respectively. The trisaccharide and the polymer with maximal  $R$  values of 2 only exhibited higher optimal concentrations (10 and 50 nM, respectively).

Kinetic measurements of  $\alpha$ -L-fucosidase activation in *R. fruticosus* protoplasts and/or cells in the presence of the inducer used at its optimal concentration and shown in Figure 3 were carried out. We verified that protoplast (or cell) viability was not affected by the treatment and remained as high as in control protoplasts (90%) or control cells (95%) throughout the experiments. When the protoplasts were challenged with XXLGol, XXFGol, XXXGol, and trisaccharide (Fig. 3, curves a, b, d, and e, respectively),



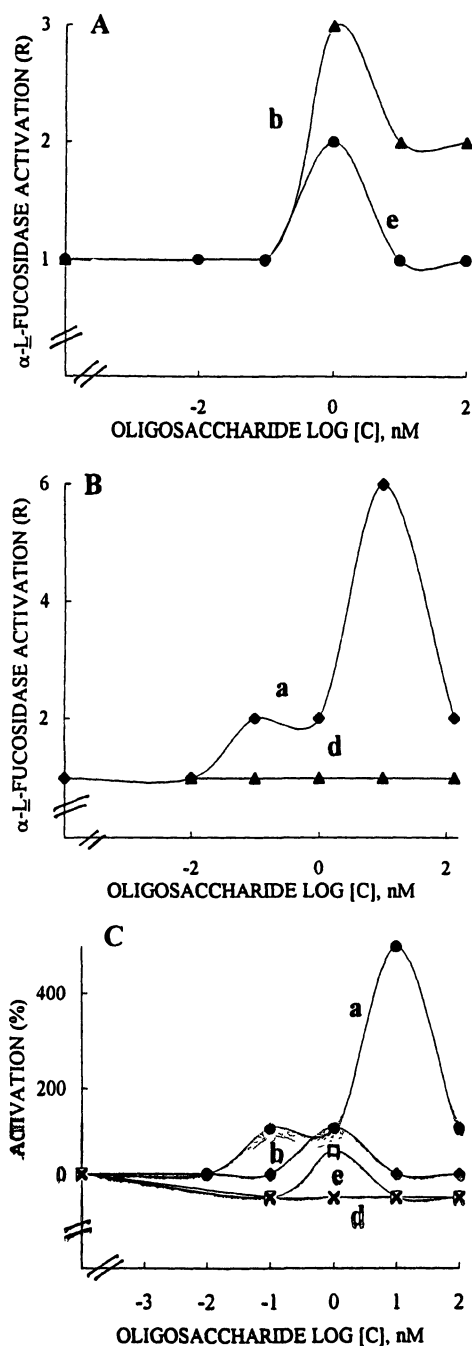
**Figure 3.** Time course for  $\alpha$ -L-fucosidase activation in *R. fruticosus* protoplasts challenged with the sugar inducers XXLGol (a), XXFGol (b), and XXXGol (d) and the trisaccharide methyl  $\alpha$ -1-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl (e). Protoplasts ( $2 \times 10^6$ ) in 25 mL of buffer were challenged with inducer used at the optimal concentration (0.1 nM XXXGol, 1 nM XXFGol, 5 nM XXLGol, and 10 nM trisaccharide). Each curve was obtained by least-squares regression of data from three to four replications carried out from three independent inducer sets.  $R$  is reported as the rate of  $\alpha$ -L-fucosidase activity of treated over control protoplasts. Control sets were run without addition of 2,4-D or oligosaccharides.

the detected responses were biphasic and triphasic with respect to their kinetics. The oscillation of the early responses of protoplasts peaked after 10 to 20 min and 45 min for the oligomers; the response to the synthetic trisaccharide was delayed, since it peaked at 30 min and 6 h. When the inducers were compared at their respective maximal  $R$  values, the order of their effectiveness between 10 and 30 min was XXFGol > XXXGol approximately trisaccharide > XXLGol, with respective  $R$  values of 5.8, 4.1, and 3. After 45 min, the order was XXXGol > XXLGol > XXFGol, with  $R$  values of 6.5, 4.7, and 1.8, respectively.

It is significant that only 10 min was required for XXXGol to trigger a response, as opposed to 15 and 20 min for XXLGol and XXFGol, respectively, and 30 min for the trisaccharide. Incubation for a longer duration of up to 96 h resulted in a large response increase;  $R$  values of 6 and 8 were found from XXXGol and XXLGol, respectively (not shown). In the presence of inhibitors of transcription (1  $\mu$ M cycloheximide) or of translation (1  $\mu$ g mL $^{-1}$  actinomycin D), the short responses of up to 45 min were maintained, whereas the long-term treatment resulted in a markedly attenuated response (40 or 50% inhibition at 96 h being detected from the XXLGol inducer). The cell-suspension cultures monitored instead of protoplasts gave rise to plateau responses, and the enzyme activation was largely attenuated, since the highest detected maximal  $R$  values were only 1.2 and 3.5 (not shown). Oligosaccharides structurally unrelated to xyloglucan, such as oligogalacturonides of 10 to 15 DP and maltopentose, were also used as potential inducers but failed to promote any response in protoplasts or in cells.

#### Effects of Xyloglucosyl Oligomers on 2,4-D-Induced $\alpha$ -L-Fucosidase Response

Induction of  $\alpha$ -L-fucosidase activity ( $R$  value of 1.5) occurred when 2,4-D was used with *R. fruticosus* protoplasts for 15 min at 10 nM. The oligomers XXFGol, XXLGol, XXXGol, and the trisaccharide methyl  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl up to 100 nM were assayed for their effect on the auxin-stimulated  $\alpha$ -L-fucosidase. One of our aims was to determine which glycosyl residues were required for modifying the  $\alpha$ -L-fucosidase response. Dose-response curves in the presence of 10 nM 2,4-D indicated that XXFGol and trisaccharide inducers exhibited a similar behavior (Fig. 4A, curves b and e, respectively). The absence of a fucosyl residue in XXLGol resulted in the promotion of enzyme activation, with an  $R$  value of about 6 (Fig. 4B, curve a), whereas XXXGol, which lacks the 2'-fucosyl Gal side chain, was not active (Fig. 4B, curve d). The data shown in Figure 4C are the percentages of modulation of 2,4-D-induced  $\alpha$ -L-fucosidase. They clearly show that the terminal galactosyl residue of XXLGol is the structural feature required to promote an  $\alpha$ -L-fucosidase response (curve a) and that the lack of the galactosyl residue led to a compound with inhibitory activity only (curve d). The presence of the fucosyl residue attached to the 2-position of the galactosyl unit common to XXFGol (curve b) and the trisaccharide methyl  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl (curve e) caused either inhibition or activa-



**Figure 4.** Effects of XXLGol (a), XXFGol (b), and XXXGol (d) and the trisaccharide methyl  $\alpha$ -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl (e) on 2,4-D-stimulated  $\alpha$ -L-fucosidase in *R. fruticosus* protoplasts. The results are expressed as the R value in A and B and as the mean percentage of activation (inhibition) of 2,4-D-stimulated response in C. Protoplasts ( $2 \times 10^6$ ) in 25 mL of buffer were incubated for 15 min with sugar inducer up to 100 nM in the presence of 10 nM 2,4-D. Each curve was obtained by least-squares regression of data from three to four replications carried out from three independent inducer sets. The induced response given as R is reported as the rate of  $\alpha$ -L-fucosidase activity of treated protoplasts over controls. The mean percentage of activation (inhibition) is calculated as  $R_{(2,4-D + oligosaccharide)} - (R_{(2,4-D)}) / (R_{(2,4-D)} - R_{(control)}) \times 100$ , where  $R_{(2,4-D + oligosaccharide)}$  and  $R_{(2,4-D)}$  are R values in protoplasts incubated with sugar inducer and 2,4-D and with 2,4-D, respectively, and  $R_{(control)}$  is the R value in protoplasts suspended in buffer without the addition of 2,4-D or oligosaccharides.

tion depending on the sugar concentration, the trisaccharide being the more potent inhibitor of these two sugars.

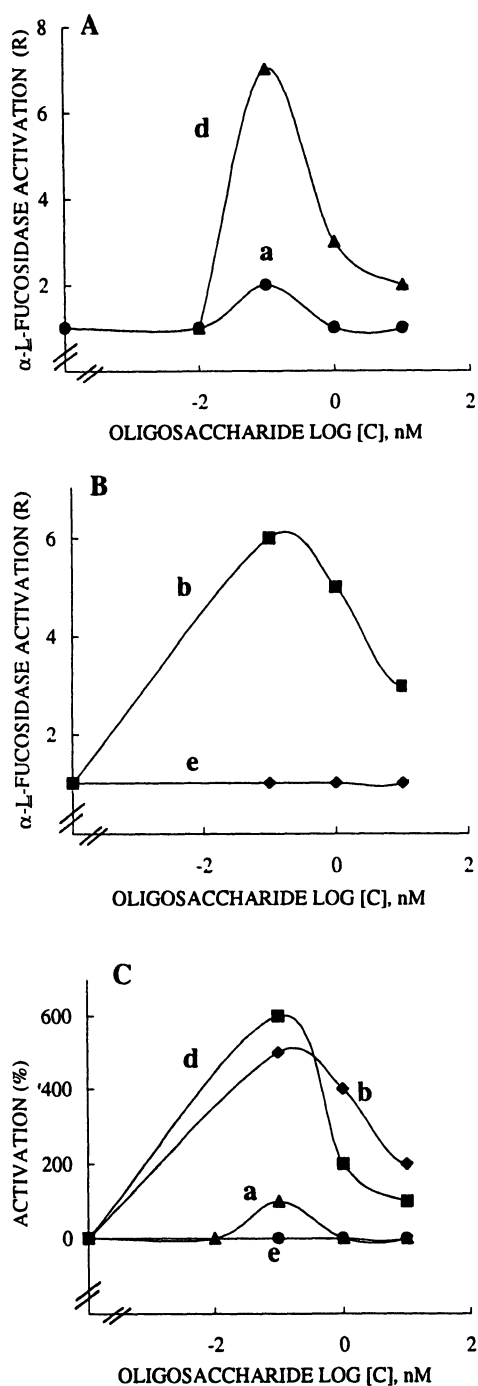
#### Effects of Xyloglucosyl Oligomers on $GA_3$ $\alpha$ -L-Fucosidase Activation

$GA_3$  acting for 15 min at 10 nM was also found to promote  $\alpha$ -L-fucosidase activation in *R. fruticosus* protoplasts (R value of about 1.5). The dose-response curves resulting from the presence of  $GA_3$  (Fig. 5, A and B) and the oligomers showed that XXXGol (curve d) and XXFGol (curve b) were highly effective in the enhancement of enzyme activation, with R values of 7 and 6, respectively. XXLGol (curve a) was less active (R value of 2 only) and the xyloglucosyl side chain of methyl  $\alpha$ -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl did not promote an increase in the  $\alpha$ -L-fucosidase response (curve e). The data shown in Figure 5C, presented as percentages of activation of  $GA_3$ -induced  $\alpha$ -L-fucosidase, clearly reveal that the presence of two xylosyl residues attached at final and penultimate Glc units are needed for the biological activity (curves d and b), but the galactosyl residue at position 2 antagonized the inducing effect of xylosyl residue, since XXLGol was poorly effective (curve a). It is significant that the presence of a terminal fucosyl residue in XXFGol (curve b) could only partially restore the activity, but this restoration required a feature mimicking the XXXGol backbone, since the trisaccharide was not active (curve e).

#### DISCUSSION

Sugar-signaling molecules of fungal or plant origin, which are produced by acidic or enzymatic hydrolysis of cell wall polysaccharides or glycoproteins, induce plant-defense responses and/or exhibit effects on growth and development (Aldington and Fry, 1993). In relation to the xyloglucan oligomers, nanomolar or micromolar concentrations with specific structural elements initiate characteristic physiological or biochemical responses. Thus, the structural features required for XXFG to exhibit an anti-auxin effect have been extensively studied (York et al., 1984; McDougall and Fry, 1988, 1989a, 1989b, 1990; Augur et al., 1992). Optimal anti-auxin activity is observed in a nanomolar range of XXFG (but not of XXLG or XXXG). XXFG is as effective as the reduced form XXFGol according to Augur et al. (1992). This effect is mimicked only by the related  $\alpha$ -L-Fuc unit containing xyloglucosyl oligomers and by the 2'-fucosyl-lactose. It has also been postulated that the activity of XXFG may be the result of two opposing effects: at lower concentrations, the Fuc-dependent-anti-auxin effect predominates, whereas at higher concentrations the Fuc-independent, growth-promoting effect is expressed.

These results suggest the presence of specific recognition systems for xyloglucan oligomers in plants. It is worth noting that when XXLG, XXXG, and XXFG promoted the elongation of pea stem segments in the absence of 2,4-D, the detected effect differed in several important respects from the growth-inhibiting effect reported above. Indeed, the optimal concentration for growth promotion is approx-



**Figure 5.** Effects of XXLGol (a), XXFGol (b), XXXGol (d) and the trisaccharide methyl  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xyl (e) on  $GA_3$ -stimulated  $\alpha$ -L-fucosidase in *R. fruticosus* protoplasts. The results are expressed as the *R* value in A and B and as the mean percentage of activation of  $GA_3$ -stimulated response in C. Protoplasts ( $2 \times 10^6$ ) in 25 mL of buffer were incubated for 15 min with sugar up to 100 nM in the presence of 10 nM  $GA_3$ . Each curve was obtained by least-squares regression of data from three to four replications carried out from three independent inducer sets. *R* is reported as the rate of  $\alpha$ -L-fucosidase activity of treated protoplasts over controls. The mean percentage of activation is calculated as  $= \frac{R_{(GA_3 + oligosaccharide)} - (R_{(GA_3)} / (R_{(GA_3)} - R_{(control)})} \times 100$ , where  $R_{(GA_3 + oligosaccharide)}$  and  $R_{(GA_3)}$  are *R* values in protoplasts incubated with sugar and  $GA_3$  and with  $GA_3$ , respectively, and  $R_{(control)}$  is the *R* value in protoplasts suspended in buffer without the addition of 2,4-D or oligosaccharides.

imately micromolar, the fucosyl residue is not required, and some of the Xyl<sub>3</sub> Glc<sub>4</sub> backbone is required. This prompted Fry et al. (1993a) to suggest that the oligosaccharides exert their effect by acting as substrates of xyloglucan endo-transglycosylase.

We have used the xyloglucan from the seeds of *H. courbaril* as a source of signaling molecules. The monosaccharide composition of this xyloglucan is Glc, Xyl, and Gal in a ratio of 50:35:13, and its structure was determined by methylation, periodate oxidation, and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy (Lima et al., 1993, 1995) to be similar to that of the well-characterized xyloglucan from the seeds of *Tamarindus indica* (Guidley et al., 1991). The polysaccharide was treated with *H. insolens* endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase I. Because it belongs to the glycosyl hydrolase family 7, the enzyme is a retaining endoglucanase that needs as a substrate an unsubstituted glucosyl unit in its subsite-1 (Armand et al., 1997), as do most of the endoglucanases used for xyloglucan degradation (Vincken et al., 1995). The enzyme preparation was free of galactosidase and xylosidase, since no monosaccharide was detected on elution with BioGel-P2. The octasaccharide, representing the basic structure of the xyloglucan, was readily obtained, as well as a minor heptasaccharide component. The resulting hepta- and octasaccharide were isolated by size-exclusion chromatography and then by HPLC; the corresponding alditols were characterized by their NMR and FAB-MS spectra. The data are in agreement with those previously published (York et al., 1993; Guillén et al., 1995).

XXLGol and XXXGol were used as signaling molecules. Purified XXLGol was shown to promote, at a nanomolar concentration range, the growth of wheat coleoptiles independently of the presence of 2,4-D, as described previously for micromolar xyloglucan in pea stem segments (McDougall and Fry, 1990). In the presence of 2,4-D, nanomolar concentrations of XXLGol increased the auxin-induced response, but 2'-fucosyl-lactose and XXFGol, to a lesser extent, can exhibit the anti-auxin effect, depending on the concentration used. Therefore, the data obtained for wheat coleoptiles confirmed that the anti-auxin activity depends on the presence of the  $\alpha$ -L-fucopyranosyl  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-D-galactopyranosyl  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ ) side chain of the xyloglucan.

The data reported for suspensions of *R. fruticosus* protoplasts (or cells) revealed that xyloglucan oligomers exhibited signaling molecules by their ability to increase  $\alpha$ -L-fucosidase activity and to modulate 2,4-D- or  $GA_3$ -induced  $\alpha$ -L-fucosidase. Here the auxin and/or the anti-auxin activity of xyloglucosyl oligomers in biological systems is totally different from that previously reported, and the  $GA_3$ -induced response confirmed the results obtained by Warneck and Seitz (1993). The biological responses mainly depended on parameters such as the structural features of the xyloglucosyl oligomers and side chain, the chemical structure of the hormone, and the sugar concentration.

It was interesting that in the presence of 2,4-D the terminal  $\beta$ -D-galactosyl residue was the determinant for biological activity: XXLGol contains the residue promoting an auxin  $\alpha$ -L-fucosidase response, and the lack of the galactosyl residue in XXXGol led to inhibitory activity. The galactosyl residue can be antagonized by a Fuc molecule at

tached to the 2 position of the galactosyl unit, as is also the case with XXFGol and synthetic trisaccharide. In the presence of GA<sub>3</sub>, the xylosyl residue(s) attached in the final or/and penultimate position is required for biological activity. They could be antagonized by the galactosyl residue at position 2, since XXLGol is not active. It was worth noting that the terminal fucosyl of the XXFGol side chain (but not the Fuc unit in a trimeric structure) revealed antagonistic effects toward galactosyl residues and the same order of effectiveness of XXFGol and XXXGol.

The protoplast responses had a very rapid and transient nature, suggesting an early signal transduction cascade. This was especially true in the case  $\alpha$ -L-fucosidase induction, which started within a few minutes after the addition of xyloglucan signals. The elicitor treatment up to 180 min did not change the total amount of extractable protein but affected the specific enzyme activity. The induction of such responses did not require the presence of cell walls, and it was fully maintained in the presence of inhibitors of transcription or translation. These results, which strongly suggest the evidence of receptor molecules for xyloglucan at plasma membranes, contribute to a more general application of the receptor hypothesis. Extensive research on signaling sugars has revealed a sequence of biochemical events, including transcription and translation of specific genes, resulting in induction de novo synthesis of enzymes, but the initial process of signal perception and transduction has still not been elucidated (Côté and Hahn, 1994). The presence of high-affinity binding sites, putative receptors for sugars (hepta  $\beta$ -glucoside [Cosio et al., 1992], *N*-acetylchitoooligosaccharide [Shibuya et al., 1993], and the trisaccharide determinant of H-type 1 human determinant [Liénard et al., 1992]), have been reported in plants, and a binding protein for a  $\beta$ -glucan elicitor of *Phytophthora megasperma* origin has been cloned (Umemoto et al., 1997). However, the initial process of perception and transduction of signaling oligosaccharides remains to be elucidated.

The present study confirmed that xyloglucan oligomers can have hormone-dependent effects in a system other than pea-stem bioassays. This had been previously reported from data on the anti-auxin activity in carrot protoplasts (Emmerling and Seitz, 1990) or on the ability of FG to control the morphogenesis in cultured wheat embryos (Pavlova et al., 1992). In addition, the effect of elongation of XXXG and XXFG was recently correlated with the viscoelastic properties of pea shoots (Cutillas-Iturralde and Lorences, 1997). McDougall and Fry (1990) and Augur et al. (1995) speculated that cellulase and  $\alpha$ -L-fucosidase activities participate in the regulation of plant growth by controlling both the hydrolysis of xyloglucan and the concentration of fucosylated oligomers.

This is consistent with our experiments showing that the treatment of *R. fruticosus* protoplasts by xyloglucosyl oligomers in the presence or absence of hormone greatly modulated the  $\alpha$ -L-fucosidase activity within a few minutes of application. When  $\alpha$ -L-fucosidase was assayed in plants (Farkas et al., 1991; Augur et al., 1995; Hoson et al., 1995), the enzyme was able to hydrolyze terminal fucosyl residues from XXFG but failed to cleave *p*-nitrophenyl

$\alpha$ -L-fucopyranoside. In contrast, we observed that the enzyme in *R. fruticosus* hydrolyzes the artificial substrate, as do the mammalian  $\alpha$ -L-fucosidases (Johnson and Alhadeff, 1991). Research is now in progress to explain these observations.

Received August 18, 1997; accepted November 17, 1997.

Copyright Clearance Center: 0032-0889/98/116/1013/09.

#### LITERATURE CITED

- Aldington S, Fry SC (1993) Oligosaccharins. *Adv Bot Res* 19: 1–107
- Armand S, Drouillard S, Schülein M, Henrissat B, Driguez H (1997) A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases. *J Biol* 272: 2709–2713
- Augur C, Stiefeld V, Darvill AG, Albersheim P, Puigdomenech P (1995) Molecular cloning and pattern of expression of an  $\alpha$ -L-fucosidase gene from pea seedlings. *J Biol Chem* 270: 24839–24843
- Augur C, Yu I, Sakai K, Ogawa T, Sinay P, Darvill AG, Albersheim P (1992) Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. *Plant Physiol* 99: 180–185
- Braccini I, Hervé du Penhoat C, Michon V, Goldberg R, Clochard M, Jarvis MC, Huang Z-H, Gage DA (1995) Structural analysis of cyclamen seed xyloglucan oligosaccharides using cellulase digestion and spectroscopic methods. *Carbohydr Res* 276: 167–181
- Bradford MM (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
- Cosio EG, Frey T, Ebel J (1992) Identification of a high-affinity binding protein for a hepta  $\beta$ -glucoside phytoalexin elicitor in soybean. *Eur J Biochem* 204: 1115–1123
- Côté F, Hahn MG (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol* 26: 1379–1411
- Cutillas-Iturralde A, Lorences EP (1997) Effect of xyloglucan oligosaccharides on growth, viscoelastic properties, and long-term extension of pea shoots. *Plant Physiol* 113: 103–109
- Emmerling M, Seitz HU (1990) Influence of a specific xyloglucan-nonascaccharide derived from cell walls of suspension-cultured cells of *Daucus carota* L. on regenerating carrot protoplasts. *Planta* 182: 174–180
- Farkas V, Hanna R, Maclachlan G (1991) Xyloglucan oligosaccharide  $\alpha$ -L-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds. *Phytochemistry* 30: 3203–3207
- Fry SC, Aldington S, Hetherington PR, Aitken J (1993a) Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol* 103: 1–5
- Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill AG, Hayashi T, Joseleau JP, Kato Y, Pérez Lorences E, Maclachlan G, McNeil MC, and others (1993b) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* 89: 1–3
- Guidley MJ, Lillford PJ, Rowlands DW, Lang P, Dentini M, Crescenzi V, Edwards M, Fanutti C, Reid JSG (1991) Structure and solution properties of tamarind seed polysaccharide. *Carbohydr Res* 214: 299–314
- Guillén R, York WS, Pauly M, An J, Impallomeni G, Albersheim P, Darvill AG (1995) Metabolism of xyloglucan xylose-deficient oligosaccharide subunits of this polysaccharide in etiolated pea. *Carbohydr Res* 277: 291–311
- Hayashi T, Wong Y, Maclachlan G (1984) Pea xyloglucan and cellulose. II. Partial hydrolysis by pea endo-1,4  $\beta$ -glucanases. *Plant Physiol* 75: 605–610
- Hetherington PR, Fry S (1993) Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 103: 987–992

- Hoson T, Tabuchi A, Masuda Y (1995) Mechanism of xyloglucan breakdown in cell walls of Azuki bean epicotyls. *J Plant Physiol* 147: 219–224
- Hustache G, Mollard A, Barnoud F (1975) Culture illimitée d'une souche anergisée de *Rosa glauca* par la technique des suspensions cellulaires. *CR Acad Sci Paris* 281: 1381–1384
- Johnson SW, Alhadeff JA (1991) Mammalian alpha-L-fucosidases. *Comp Biochem Physiol* 99: 479–488
- Joseleau JP, Cartier N, Chambat G, Faik A, Ruel K (1992) Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. *Biochimie* 74: 81–88
- Lee YE, Zeikus JG (1993) Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. *J Gen Microbiol* 139: 1235–1243
- Liénart Y, Dubois-Dauphin R, Gautier C, Khitri M, Driguez H (1992) Membrane binding sites for the human blood group H-type 2 determinant, an inducer of laminarinase activity in protoplasts of *Rubus fruticosus* L. *Planta* 188: 506–512
- Lima NN, Rechia CGV, Ganter JLMS, Reicher, F, Sierakowski MR (1995) Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa*. *Int J Biol Macromol* 17: 413–415
- Lima NN, Reicher F, Correa JB, Ganter JLMS, Sierakowski MR (1993) Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (jatobá). *Cienc Cult* 45: 22–26
- Lopez R, Montero E, Sanchez F, Canada J, Fernandez-Mayoralas A (1994) Regioselective acetylation of alkyl  $\beta$ -D-xylopyranosides by use of lipase PS in organic solvents and application to the chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides. *J Org Chem* 59: 7027–7032
- McDougall GJ, Fry SC (1988) Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. *Planta* 175: 412–416
- McDougall GJ, Fry SC (1989a) Anti-auxin activity of xyloglucan oligosaccharides: the role of groups other than the terminal  $\alpha$ -L-fucose residue. *J Exp Bot* 40: 233–238
- McDougall GJ, Fry SC (1989b) Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. *Plant Physiol* 89: 883–887
- McDougall GJ, Fry SC (1990) Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase. Evidence for a role of cellulose in cell expansion. *Plant Physiol* 93: 1042–1048
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P (1984) Structure and function of the primary cell wall of plants. *Annu Rev Biochem* 53: 625–663
- Pavlova ZN, Ash AO, Vnuchkova VA, Babakov AV, Torgov VI, Nechaev OA, Usov AI, Shibaev VN (1992) Biological activity of a synthetic pentasaccharide fragment of xyloglucan. *Plant Sci* 85: 131–134
- Reid JSG (1985) Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". *Adv Bot Res* 11: 125–155
- Shibuya N, Kaku H, Kuchitsu K, Maliarik MJ (1993) Identification of a novel binding site for *N*-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. *FEBS Lett* 329: 75–78
- Siddiqui R, Wood PJ (1977) Structural investigation of sodium hydroxide-soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. *Carbohydr Res* 53: 85–94
- Stephen AM (1983) Other plant polysaccharides. In GO Aspinall, ed, *The Polysaccharides*, Vol 2. Academic Press, New York, pp 105–181
- Umemoto N, Karitani M, Iwamatsu A, Yoshikawa M, Yamaoka N, Ishida I (1997) The structure and function of a soybean  $\beta$ -glucan-elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1029–1034
- Vincken JP, de Keizer A, Beldman G, Voragen AGJ (1995) Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. *Plant Physiol* 108: 1579–1585
- Warneck H, Seitz HU (1993) Inhibition of gibberellic acid-induced elongation growth of pea epicotyls by xyloglucan oligosaccharides. *J Exp Bot* 44: 1105–1109
- Yang T, Davies PJ, Reid JB (1996) Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. *Plant Physiol* 110: 1029–1034
- York WS, Darvill AG, Albersheim P (1984) Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. *Plant Physiol* 75: 295–297
- York WS, Harvey LK, Guillén R, Albersheim P, Darvill AG (1993) Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase digestion and spectroscopic methods. *Carbohydr Res* 248: 285–301