

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

**MODULAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM
CÉLULAS DE CENOURA (*Daucus carota*):
ATIVIDADE DE POLISSACARÍDEOS CONTENDO
XILOSE E ARABINOSE**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio I e II em Botânica como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Adauto Bellarmino de Pereira Netto (Departamento de Botânica - UFPR)

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Maurer Menestrina (Departamento de Bioquímica - UFPR)

CURITIBA

2002

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque Ele está no controle de todas as coisas e me concedeu sabedoria, paz e determinação para chegar até aqui... Obrigada por eu ter Te conhecido!

Ao meu orientador Aducto Bellarmino de Pereira Netto, por ter se proposto a me ensinar praticamente tudo que sei sobre cultura de células, embriogênese somática, etc., sem contar nos ensinamentos sobre a ciência e de como "ser cientista" hoje em dia. Obrigada pelo incentivo e pela amizade.

À minha co-orientadora e amiga Juliana Maurer Menestrina, por ter incentivado este trabalho desde o início e por ter acreditado em mim durante estes 4 anos que estivemos juntas. Obrigada por tudo, por ter me iniciado na carreira científica, me auxiliado nas horas mais difíceis e dividido comigo as vitórias. Aprendi muito com você, não só de química de carboidratos...

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, onde comecei e vou continuar minha carreira científica. Especialmente ao prof. Marcello Iacomini e Philip Gorin e ao Rodrigo Reis pela participação na caracterização dos polissacarídeos (PN, PHPI e PDSI).

Ao Departamento de Botânica da UFPR, onde fui muito bem recebida para a realização desta monografia. Especialmente à professora Cecília Iritani, pelo uso do laboratório de micropropagação vegetal.

À minha mãe, por não medir esforços para realizar os meus sonhos, por ser companheira, amiga, batalhadora... Com certeza as minhas vitórias são também suas porque você me deu seu exemplo de vida e por isso cheguei até aqui. Te amo!

Às minhas irmãs Flávia e Renata, por acreditarem na minha profissão, entenderem meus momentos de mau humor e às vezes aguentarem minhas reclamações. Muito obrigada por vocês existirem e fazerem minha vida mais feliz!

À minha vó Maria, não tenho nem palavras para dizer o quanto lhe sou grata! Um beijo com amor...

Ao meu tio Fernando, pelas muitas conversas e pelo incentivo que sempre me deu para eu ser Bióloga!

A todas as pessoas da minha família que não estão sendo citadas nominalmente mas que me apoiaram nesta caminhada, o carinho e o amor delas foi muito estimulante!

Ao meu namorado Moacir, por ter me acompanhado durante o período da faculdade e ter se esforçado para entender meu trabalho. Obrigada pelo seu amor, sua compreensão e seu apoio. Você é muito especial para minha vida! Te amo!

Às minhas super amigas Ana Paula, Carolina, Luciana e Mariana, que fizeram da minha vida uma grande alegria, por me ajudarem a resolver problemas, por se alegrarem com cada conquista ou apenas por estarem comigo... Amo vocês!

Ao meu amigo Ricardo, por ser meu companheiro de faculdade e amigo para todas as horas.

À Roseli e Mauren, por serem grandes amigas e me ajudarem nas épocas mais difíceis, nem que seja com uma palavra de carinho e apoio.

Aos amigos Yara, Carol, Helen e Cleiton, por terem me ensinado coisas que a ciência não explica.

Aos meus amigos do laboratório Rodrigo Reis, Rodrigo Vassoler e Ricardo Wagner, pela convivência, pela amizade e por me ajudarem em muitas situações.

A todos os meus colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, com certeza vocês são especiais... Obrigada pelos momentos agradáveis, pelas conversas científicas e por aquelas informais, onde aprendi muitas coisas sobre a vida!

Às minhas colegas do Departamento de Botânica, Cláudia e Silvia, com quem pude contar nas horas difíceis e "estressantes" dos experimentos, obrigada pela força que sempre me deram.

Enfim, a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente neste trabalho e na minha vida, quero agradecer sinceramente...

Ao CNPq - PIBIC e à UFPR - TN, pelas bolsas de iniciação científica concedidas.

Ao PRONEX – Carboidratos e ao CNPq (processo 420087/00-1, Juliana Maurer Menestrina), pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Embriogênese somática.....	1
1.2 Efeitos de carboidratos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal..	3
1.3 Justificativas.....	4
2 OBJETIVOS	6
3 MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 Material vegetal.....	7
3.1.1 Germinação de sementes.....	7
3.1.2 Indução de calo.....	7
3.2 Estabelecimento e manutenção de culturas de células de <i>Daucus carota</i> em suspensão.....	7
3.3 Polissacarídeos utilizados nos experimentos biológicos.....	10
3.3.1 Polissacarídeo nativo sulfatado (PNS).....	10
3.3.1.1 Modificação química por sulfatação.....	10
3.3.1.2 Determinação do grau de substituição (D.S.) do PNS.....	11
3.3.1.3 Determinação da composição monossacarídica do PNS.....	11
3.3.1.4 Determinação da homogeneidade e da massa molecular média ponderal, em massa (M_w), do PNS.....	11
3.4 Experimentos para avaliação de atividade biológica dos polissacarídeos.	14
3.4.1 Preparo e esterilização dos polissacarídeos.....	14
3.4.2 Embriogênese somática e formação de plântulas.....	14
3.4.3 Crescimento vegetal – efeito sobre a matéria fresca e seca.....	15
3.4.4 Análise estatística.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Aspectos estruturais dos polissacarídeos utilizados.....	16
4.2 Experimentos para avaliação de atividade biológica.....	18
4.2.1 Efeito dos polissacarídeos sobre a embriogênese somática de células de cenoura.....	18

4.2.1.1 Efeito do polissacarídeo nativo (PN).....	19
4.2.1.2 Efeito do polissacarídeo sulfatado (PNS).....	21
4.2.1.3 Efeito do polissacarídeo hidrolisado (PHPI).....	23
4.2.1.4 Efeito do polissacarídeo degradado (PDSI).....	25
4.2.2 Efeitos dos polissacarídeos sobre a formação de plântulas.....	30
4.2.3 Efeitos dos polissacarídeos sobre o crescimento vegetal – matéria fresca e matéria seca.....	37
4.3 Discussão geral.....	43
5 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01:** Esquema do estabelecimento, manutenção da cultura de células e desenvolvimento dos embriões somáticos de cenoura. Fonte: ZIMMERMAN (1993) com modificações..... 9
- FIGURA 02:** Esquema de obtenção do polissacarídeo nativo do exsudato de *Syagrus romanzoffiana* e de 3 derivados modificados quimicamente..... 13
- FIGURA 03:** Aspecto geral da cultura de células de cenoura (aumento 2,87 X) após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS na ausência de 2,4-D e de polissacarídeos (grupo controle). No detalhe, um embrião no estágio cotiledonar de desenvolvimento (aumento 8,2 X). Setas indicam a presença de embriões no estágio cotiledonar (a) e grupo de células indiferenciadas (b)..... 18
- FIGURA 04:** Efeito do PN sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%..... 20
- FIGURA 05:** Efeito do PNS sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%..... 22

- FIGURA 06:** Aspecto geral da cultura de células de cenoura (aumento 2,87 X), após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS sólido enriquecido com PNS (20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Setas indicam a presença de embriões no estágio cotiledonar..... 23
- FIGURA 07:** Efeito do PHPI sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%..... 24
- FIGURA 08:** Efeito do PDSI sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%..... 26
- FIGURA 09:** Aspecto geral da cultura de células de cenoura (aumento 2,87 X), após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS sólido enriquecido com PDSI (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Setas indicam a presença de embriões no estágio cotiledonar..... 27
- FIGURA 10:** Efeito do PN sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1386x^2 - 1,0254x + 2,706$ 31
- FIGURA 11:** Efeito do PNS sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1743x^2 - 1,0897x + 2,786$ 31

- FIGURA 12:** Efeito do PHPI sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1607x^2 - 1,0093x + 3,092$ 32
- FIGURA 13:** Efeito do PDSI sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1729x^2 - 1,0231x + 2,846$ 32
- FIGURA 14:** Efeito do PN sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,2407x^2 - 1,2993x + 5,46$ 34
- FIGURA 15:** Efeito do PNS sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 6,0249 e^{-0,091x}$ 34
- FIGURA 16:** Efeito do PHPI sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 5,4656 e^{-0,0817x}$ 35
- FIGURA 17:** Efeito do PDSI sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1164x^2 - 0,9296x + 5,602$ 35

- FIGURA 18:** Efeito do PN sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = 0,25x^2 + 0,33x + 165,96$ (matéria fresca) e $y = 0,5143x^2 - 3,5257x + 19,47$ (matéria seca)..... 39
- FIGURA 19:** Efeito do PNS sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = 2,2571x^2 - 15,143x + 181,93$ (matéria fresca) e $y = 0,6071x^2 - 3,9129x + 19,91$ (matéria seca)..... 40
- FIGURA 20:** Efeito do PHPI sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = -0,854x + 170,21$ (matéria fresca) e $y = 16,191x^{-0,0695}$ (matéria seca)..... 41
- FIGURA 21:** Efeito do PDSI sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = 3,129x + 161,2$ (matéria fresca) e $y = 15,952x^{-0,0843}$ (matéria seca)..... 42

LISTA DE TABELAS

TABELA I: Aspectos estruturais relacionados com os polissacarídeos PN, PNS, PHPI e PDSI.....	17
TABELA II: Efeito dos polissacarídeos PN, PNS, PHPI e PDSI sobre o número total e o número de embriões no estágio cotiledonar formados a partir de células de cenoura cultivadas <i>in vitro</i> , ao final do período de cultivo (4º semana).....	28
TABELA III: Efeito do PN, PNS, PHPI e PDSI sobre o número de plântulas e sobre o comprimento total das plântulas formadas ao final do período de cultivo (4º semana).....	36

RESUMO

Em virtude do envolvimento de carboidratos na modulação de eventos de importância regulatória para o crescimento e o desenvolvimento vegetal, o presente trabalho propôs analisar o efeito do polissacarídeo obtido a partir do exsudato de *Syagrus romanzoffiana* (Gerivá) (PN) e de 3 derivados modificados quimicamente sobre a embriogênese somática em células de cenoura (*Daucus carota*) cultivadas *in vitro*. O PN foi quimicamente modificado por hidrólise ácida parcial, obtendo-se o polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PHPI), degradação controlada de Smith, obtendo-se o polissacarídeo degradado (PDSI) e sulfatação, obtendo-se o polissacarídeo nativo sulfatado (PNS). O PN, o PHPI e o PDSI foram previamente caracterizados quimicamente no Laboratório de química de carboidratos de exsudatos vegetais, Departamento de Bioquímica (UFPR), e apresentaram-se constituídos por xilose, arabinose, ramnose e ácidos urônicos na razão molar de 48:24:20:8, 82:2:8:8 e 85:12:0:3, respectivamente. O PN foi modificado quimicamente através de sulfatação, onde obteve-se um polissacarídeo sulfatado (PNS) (D.S. 0,7), que, após análise em GC-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa) apresentou-se constituído por xilose, arabinose e ramnose na razão molar de 51:25:24, além de ácidos urônicos. Após análise em HPSEC-MALLS (cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores), verificou-se a homogeneidade do PNS e a massa molecular média calculada foi de $1,48 \times 10^5$ g.mol⁻¹. Nos testes realizados neste trabalho, foram avaliados os efeitos dos polissacarídeos sobre a formação de embriões somáticos totais, embriões no estágio cotiledonar, plântulas e também sobre o crescimento, em termos de matéria fresca e seca. Células formadas a partir de tecido de calo crescendo *in vitro* foram cultivadas na presença do PN e de seus derivados (PNS, PHPI e PDSI) nas concentrações 0,1, 1, 20 e 60 µg.ml⁻¹. Um aumento significativo ($p \leq 0,05$) de 68% e 84% sobre o número total de embriões e número de embriões no estágio cotiledonar, respectivamente, foram observados para células crescidas em meio de cultura enriquecido com 60 µg.ml⁻¹ de PDSI. Um aumento de 32% no número de embriões no estágio cotiledonar foi verificado para células crescidas na presença do PN (0,1 µg.ml⁻¹). O número total de embriões foi reduzido ($p \leq 0,05$) em 33% e 46%, respectivamente, para células crescidas em meio de cultura contendo PNS na concentração 1 e 20 µg.ml⁻¹. A formação de embriões no estágio cotiledonar foi também inibida (em 48%) ($p \leq 0,05$) na presença de PNS (20 µg.ml⁻¹). Observou-se uma tendência de inibição na formação de plântulas a partir dos embriões somáticos formados na presença de todos os polissacarídeos testados. Porém, esta inibição se mostrou estatisticamente significativa apenas para o PN e o PNS, ambos na concentração de 0,1 µg.ml⁻¹, onde ocorreu uma diminuição de 86% e 77% no número de plântulas. A presença dos polissacarídeos no meio de cultura, em quaisquer das concentrações testadas, não causou alteração estatisticamente significativa na acumulação de matéria fresca analisada. Todos os polissacarídeos testados causaram redução ($p \leq 0,05$) no acúmulo da matéria seca, sendo que concentrações baixas causaram a inibição máxima observada. Estes resultados sugerem que as moléculas utilizadas nestes experimentos alteram o padrão de crescimento, em termos de massa, de células de cenoura crescidas *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Os tecidos vegetais têm a capacidade de formar gemas, raízes ou embriões somáticos quando cultivados *in vitro*, demonstrando que tecidos isolados possuem potencialidade para regenerar plantas, quando submetidas a tratamento adequado. Esta propriedade é chamada de totipotencialidade das células vegetais (ZIMMERMAN, 1993; GUERRA *et al.*, 1999).

Existem dois mecanismos pelos quais um tecido vegetal pode regenerar uma planta completa: organogênese e embriogênese somática. A embriogênese somática é o processo pelo qual células desenvolvem-se por meio de uma série de estádios embriogênicos dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

A embriogênese somática pode ser utilizada como ferramenta para entender a regulação da expressão gênica que ocorre nos eventos iniciais do desenvolvimento das plantas superiores, ou seja, o desenvolvimento do zigoto até o embrião maduro. O embrião zigótico é circundado pelo endosperma e pelas células do tecido materno o que dificulta análises bioquímicas e moleculares do desenvolvimento inicial do embrião em função da presença de uma barreira física. Em contrapartida, o embrião somático não possui endosperma nem interações com o tecido do explante inicial, possibilitando a aplicação de várias análises fisiológicas e genéticas (ZIMMERMAN, 1993). Do ponto de vista comercial, a maior aplicação da embriogênese somática é a multiplicação clonal em grande escala de plantas de importância agrônômica e florestal (MERKLE *et al.*, 1990; ZIMMERMAN, 1993). Esse sistema também tem sido usado para produção de plantas transgênicas (PRAKASH e VARADARAJAN, 1992) e sementes sintéticas (SCHULTHEIS *et al.*, 1990).

Existem dois modelos para a indução da embriogênese somática *in vitro*: modelo direto e indireto. No modelo direto, os embriões se originam a partir de tecidos-matrizes sem a formação do estágio intermediário de calo, como ocorre no modelo indireto (GUERRA *et al.*, 1999).

O fenômeno da embriogênese somática tem sido amplamente estudado em cenoura e outros membros da família Umbelliferae (WAKE, 1995). Este é um sistema modelo e a maior vantagem é a produção relativamente simples de embriões somáticos sob condições controladas em culturas líquidas (WAKE, 1995). Culturas de células de cenoura podem facilmente ser estabilizadas diretamente em meio líquido e grandes quantidades de embriões somáticos podem ser obtidos (KREUGER e VAN HOLST, 1996).

A fonte dos explantes (pequenos órgãos ou pedaços de tecidos), a composição do meio de cultura, a concentração osmótica e a luz são fatores que afetam a embriogênese somática (GUERRA *et. al.*, 1999).

Em cenoura, as auxinas, como o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), estão envolvidas na formação de calos embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (KOMAMINE *et al.*, 1992). A formação de embriões em estádios posteriores ao globular é inibida na presença de auxina, em especial do 2,4-D. Portanto, o desenvolvimento só ocorre após a transferência do calo ou suspensão celular para meio isento ou com reduzidas concentrações de auxina (JIMÉNEZ, 2001).

O processo básico de desenvolvimento de embriões somáticos a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro* consiste de dois estágios principais. No primeiro, um explante juvenil ou embrionário é inoculado em meio contendo 2,4-D. Essas culturas são mantidas no escuro e geram massas celulares pró-embriônicas (PEMs) (calos embriogênicos) que podem, por processos de clivagem e gemação, formar embriões globulares com alta eficiência (KREUGER e VAN HOLST, 1996). No segundo, o 2,4-D é retirado do meio e os pró-embriões prosseguem o desenvolvimento até formarem embriões maduros (GUERRA *et. al.*, 1999). Após 5 a 7 dias da retirada da auxina, os embriões estão no primeiro estágio de desenvolvimento chamado *globular*, onde as células apresentam tamanho pequeno e arredondado. A segunda fase é o estágio de *coração* (2 a 3 dias mais tarde) onde as células apresentam crescimento isodiamétrico, com forma semelhante a um coração. Posteriormente os embriões passam para a fase de *torpedo* (*cotiledonar*) seguida da formação de plântulas. Cerca de 3 semanas após a indução, as plântulas

podem apresentar cotilédones verdes, hipocótilos alongados e desenvolvimento de raízes (ZIMMERMAN, 1993).

1.2 EFEITOS DE CARBOIDRATOS SOBRE O CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO VEGETAL

Carboidratos são capazes de modular eventos de importância regulatória para o crescimento e desenvolvimento celular, tais como a fosforilação de proteínas, o fluxo iônico e potenciais de ação (RYAN e FARMER, 1991). O tratamento com carboidratos exógenos, em concentrações da ordem de nanomolar, tem se mostrado capaz de alterar o padrão de diferenciação de células vegetais (VARGAS-RECHIA *et al.*, 1998; PEREIRA-NETTO *et al.*, 1998). Dentre os carboidratos que exercem atividade regulatória, pode-se destacar as oligossacarinas e as arabinogalactanas-proteínas.

Oligossacarídeos podem atuar como moléculas sinalizadoras, chamadas de oligossacarinas, em vários sistemas vegetais, como nos mecanismos de defesa, envolvidos com a produção de fitoalexinas, e nos processos associados com o desenvolvimento vegetal, como a morfogênese e a produção de etileno (RYAN e FARMER, 1991; DINAND *et al.*, 1997). Alguns estudos têm mostrado que oligossacarídeos de xiloglucanas, componentes hemicelulósicos abundantes na parede celular vegetal, suplementados, podem atuar como sinalizadores no processo de crescimento vegetal, através de receptores de membrana altamente específicos, inibindo o alongamento induzido por auxina (McDOUGALL e FRY, 1988; VARGAS-RECHIA *et al.*, 1998).

Estudos têm mostrado que sinais que afetam a diferenciação celular podem, hipoteticamente, liberar polissacarídeos biologicamente ativos, que por sua vez, afetam o crescimento celular e os processos de desenvolvimento vegetal (TRAN THAN VAN e MUTAFTSCHIEV, 1990). Para o processo de diferenciação celular, a localização da célula é um importante determinante, assim, a identidade das células vizinhas parece influenciar mais do que a célula-mãe, indicando que os eventos iniciais de diferenciação, provavelmente, ocorrem na superfície celular (MAJEWSKA-SAWKA e NOTHNAGEL, 2000). Muitos estudos estão sendo realizados com o

objetivo de investigar a função de moléculas que possivelmente estão envolvidas nos mecanismos de reconhecimento e sinalização célula-célula, como é o caso das arabinogalactana-proteínas (MAJEWSKA-SAWKA e NOTHNAGEL, 2000).

Arabinogalactanas-proteínas (AGPs) são proteoglicanas que possuem aproximadamente 90% de carboidratos e 10% de conteúdo proteico e estão presentes em membranas e paredes celulares e nos espaços intercelulares (KREUGER e VAN HOLST, 1993, 1996; TOONEN *et al.*, 1997).

As AGPs estão relacionadas com o desenvolvimento vegetal, reconhecimento célula-célula, expansão, proliferação e morte celular, estabelecimento da identidade celular e o controle da embriogênese somática (CLARKE *et al.*, 1979; SERPE e NOTHNAGEL, 1996; MAJEWSKA-SAWKA e NOTHNAGEL, 2000). AGPs provenientes de células cultivadas de cenoura (*Daucus carota*), isoladas através de técnicas imunológicas baseadas em epítomos específicos, têm-se mostrado capazes de alterar o padrão de diferenciação de embriões somáticos de cenoura (TOONEN *et al.*, 1997). AGPs isoladas de sementes de cenoura têm sido utilizadas para aumentar o potencial embriogênico em células de *Cyclamen persicum* (KREUGER *et al.*, 1995), mostrando que a atividade dessas moléculas não é espécie-específica. As AGPs têm se mostrado capazes de restaurar o potencial embriogênico em culturas não-embriogênicas de células de cenoura em suspensão. Linhagens celulares maduras que já haviam perdido a habilidade de desenvolver embriões somáticos, puderam restabelecer seu potencial embriogênico pela adição de AGPs extraídas de sementes de cenoura (KREUGER e VAN HOLST, 1993).

As AGPs podem atuar através de diferentes mecanismos de ação. A presença destas moléculas no lado externo da membrana plasmática pode sugerir que elas atuem entre a membrana e a matriz extracelular, desempenhando um papel de mensageiro em interações entre as células durante o processo de diferenciação (KREUGER e VAN HOLST, 1996).

1.3 JUSTIFICATIVAS

Tendo em vista que polissacarídeos, a exemplo de arabinogalactana-proteínas, têm-se mostrado capazes de modular processos de diferenciação celular,

propusemos neste trabalho investigar possíveis efeitos de uma heteroxilana ácida isolada a partir do exsudato de *Syagrus romanzoffiana* (Gerivá) (Arecaceae), bem como de 3 derivados modificados quimicamente na modulação do padrão de formação e de desenvolvimento de embriões somáticos em *Daucus carota* (cenoura). Pode-se enfatizar também que, na literatura, não foram encontrados dados referentes à atividade biológica em questão de polissacarídeos do tipo heteroxilanas e arabinoxilanas, como é o caso.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a potencial atividade regulatória de uma heteroxilana ácida (PN) e de seus 3 derivados modificados quimicamente sobre a embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota*) visando o aprimoramento dessa técnica de propagação vegetativa *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- Modificar quimicamente o polissacarídeo nativo (PN) do exsudato vegetal de *S. romanzoffiana* por técnica de sulfatação e analisar quimicamente o polissacarídeo sulfatado resultante (PNS);
- Avaliar o potencial efeito de uma heteroxilana ácida, bem como de seus 3 derivados modificados quimicamente, sobre a formação e o desenvolvimento de embriões somáticos de cenoura;
- Avaliar o potencial efeito de uma heteroxilana ácida e de seus 3 derivados modificados quimicamente sobre a formação de plântulas;
- Avaliar o potencial efeito de uma heteroxilana ácida e de seus 3 derivados modificados quimicamente sobre o crescimento vegetal, utilizando como parâmetros a acumulação de matéria fresca e de matéria seca em células de cenoura crescidas *in vitro*;
- Sugerir relações entre a estrutura química e o efeito fisiológico dos diferentes polissacarídeos utilizados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Sementes de cenoura (*Daucus carota* L.), variedade Brasília de verão, tiveram sua superfície esterilizada primeiramente por imersão em etanol 80% (v/v), sob agitação, durante 2 minutos seguida por imersão, sob agitação, durante 5 minutos, em hipoclorito de sódio a 50% (v/v). Posteriormente foram feitas três lavagens (2 minutos cada uma) em água destilada estéril. As sementes foram então semeadas em meio de cultura MS sólido (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo (μ M): 555 mio – inositol, 4,06 ácido nicotínico, 2,43 piridoxina – HCl, 26,64 glicina, 6,25 tiamina – HCl, 3% (m/v) sacarose e ágar a 0,7% (m/v), para solidificar o meio. Posteriormente foram mantidas em sala de cultura climatizada com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar média igual a $70\pm 5\%$.

3.1.2 INDUÇÃO DE CALO

Segmentos de hipocótilos de cenoura, medindo cerca de 15 mm de comprimento, obtidos a partir de plântulas crescidas *in vitro* (item 3.1.1), foram cultivados em frascos contendo 40ml de meio de cultura MS sólido (MURASHIGE e SKOOG, 1962), como descrito no item 3.3.1, suplementado com $1\mu\text{M}$ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos em sala de cultura climatizada, por um período de aproximadamente 90 dias, no escuro, como descrito no item 3.1.1.

3.2 ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS DE *Daucus carota* EM SUSPENSÃO

Células originadas a partir de tecido de calo proveniente de hipocótilo de cenoura (*Daucus carota*) (item 3.1.2) foram cultivadas em meio de cultura básico MS

(MURASHIGE e SKOOG, 1962) de composição idêntica ao meio de cultura descrito no item 3.1.1, exceto pelo fato de que para as culturas de células em suspensão $1\mu\text{M}$ de 2,4-D foi adicionado ao meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e posteriormente o meio foi autoclavado a 120°C a 1,5 atm. As suspensões celulares foram crescidas sob agitação permanente (100 rpm), no escuro, na temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar igual a $70 \pm 5\%$. Alíquotas desta cultura ($200\ \mu\text{l}$), após filtração em tela de nylon com malha de $300\ \mu\text{m}$, foram distribuídas em meio de cultura MS sólido, na ausência de 2,4-D, e enriquecidos ou não com os polissacarídeos a serem testados (item 3.4). O esquema do estabelecimento, manutenção da cultura de células e desenvolvimento dos embriões somáticos de cenoura está apresentado na Figura 01.

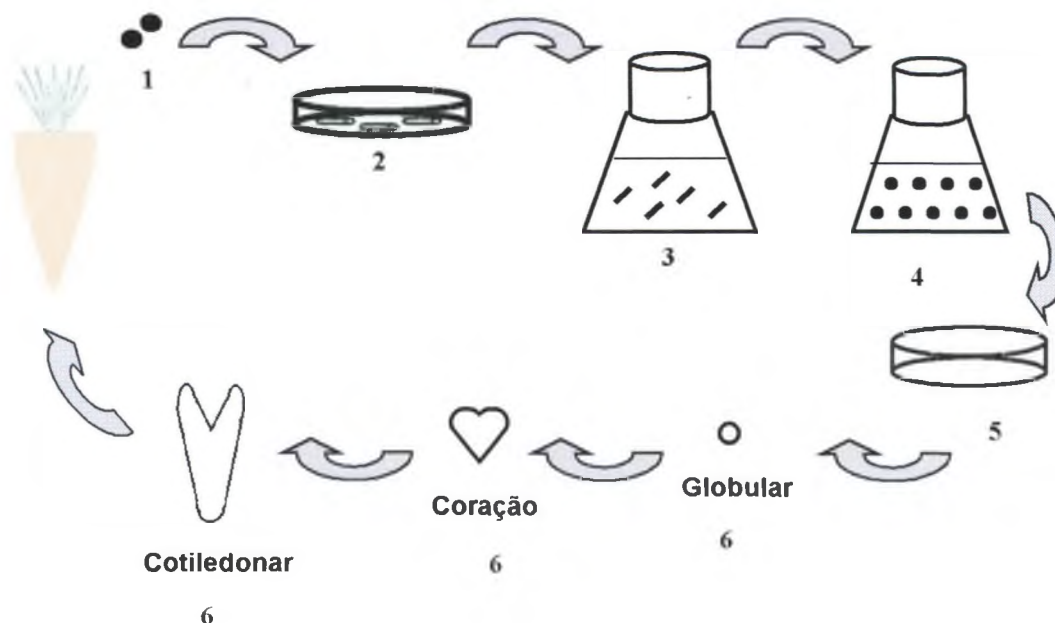


Figura 01: Esquema do estabelecimento, manutenção da cultura de células e desenvolvimento dos embriões somáticos de cenoura. Fonte: ZIMMERMAN (1993) com modificações.

1. Germinação de sementes estéreis (etapa não apresentada na figura).
2. Indução de calo a partir de hipocótilo (meio de cultura MS, MURASHIGE e SKOOG, 1962, suplementado com $1 \mu\text{M}$ de ácido diclorofenóxiacético, 2,4-D, e ágar a 0,7% (m/v); Condições de crescimento: no escuro, temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar igual a $70 \pm 5\%$).
3. Estabelecimento de cultura de células em suspensão a partir de calo proveniente de hipocótilo (meio de cultura MS suplementado com $1 \mu\text{M}$ de 2,4-D). Condições de crescimento: agitação (100 rpm), no escuro, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar igual a $70 \pm 5\%$.
4. Manutenção da cultura de células em suspensão: Subcultivo (10 mL da suspensão em 40 mL de meio de cultura utilizado para o estabelecimento da cultura) a cada 15 dias.
5. Alíquotas ($200 \mu\text{l}$) da cultura filtrada foram inoculadas em meio de cultura MS sólido, enriquecidos ou não com polissacarídeos, na ausência de 2,4-D.
6. Estádios de desenvolvimento dos embriões.

3.3 POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS

O polissacarídeo nativo (PN), obtido do exsudato vegetal de *Syagrus romanzoffiana* (Gerivá) (Família Arecaceae) e 3 derivados modificados quimicamente: PNS, polissacarídeo nativo após sulfatação, PHPI, polissacarídeo após hidrólise ácida parcial e PDSI, polissacarídeo após degradação controlada de Smith, foram utilizados para os testes biológicos (item 3.4). O resumo das metodologias utilizadas para obtenção dos diferentes polissacarídeos está apresentado na Figura 02. O PN, PHPI e PDSI foram previamente caracterizados quimicamente (SIMAS, *et al.*, 2001) no laboratório de química de carboidratos de exsudatos vegetais, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, sob orientação da prof.^a Dr.^a Juliana Maurer Menestrina e coordenação do prof. Dr. Marcello Iacomini e foram gentilmente cedidos para estes experimentos.

3.3.1 POLISSACARÍDEO NATIVO SULFATADO

3.3.1.1 MODIFICAÇÃO QUÍMICA POR SULFATAÇÃO

O polissacarídeo nativo (PN) foi sulfatado utilizando a metodologia descrita por O'NEILL (1955). Para isso, cerca de 500 mg de PN foi dissolvido em formamida (10 mL), sob constante agitação, evitando-se a hidratação do meio reacional. Após a total solubilização da amostra, adicionou-se piridina (10 mL) e ácido clorosulfônico (1,5 mL) (agente sulfatante). Durante esta adição, a mistura reacional permaneceu em banho de gelo sob constante agitação. Após adição total do ácido, a agitação em banho de gelo foi mantida por mais 2 horas. Decorrido este tempo, a solução foi mantida em geladeira por 24 horas.

A reação foi interrompida pela adição de gelo ao sistema e neutralizada com uma solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v) até pH 7,0. Em seguida, a solução obtida foi dialisada contra água corrente por 3 dias e contra água destilada por 3 dias sendo, posteriormente liofilizada, obtendo-se assim um polissacarídeo sulfatado (PNS) (628 mg).

3.3.1.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S) DO PNS

O grau de substituição (D.S) do derivado sulfatado (PNS) foi obtido através do método turbidimétrico por precipitação com uma solução de cloreto de bário / gelatina (oxóide) (DOGSON e PRICE, 1962). O PNS (3 mg) foi hidrolisado com 3 ml de HCl 1M durante 5 horas a 110°C. Uma alíquota de 0,2 mL da amostra hidrolisada foi tratada com 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 3% (m/v) e com 1,0 mL de solução de cloreto de bário / gelatina. A mistura reacional permaneceu em repouso durante 15 minutos tendo sido então a absorbância determinada a 360 nm em espectrofotômetro. O teor de sulfato foi determinado utilizando-se a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 100 µg).

O D.S. foi determinado a partir da seguinte relação:

$$D.S. = 148 \times S / 3200 - (102 \times S)$$

Onde S representa o teor de enxofre dado em %.

3.3.1.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO PNS

O polissacarídeo sulfatado foi submetido à hidrólise ácida total (TFA, 1M, 8 h, 100°C) (GORIN *et al.*, 1996) seguida de redução (NaBH₄) e acetilação (anidrido acético : piridina – 1:1 v/v). Os acetatos de alditóis obtidos foram extraídos com clorofórmio e posteriormente analisados em cromatógrafo a gás VARIAN, série 3.300, acoplado a espectrômetro de massa FINNIGAN MAT modelo ITD 800, utilizando coluna DB-225 (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) (GC-MS), obtendo-se assim a composição de monossacarídeos neutros. A dosagem de ácidos urônicos não foi realizada.

3.3.1.4 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE E DA MASSA MOLECULAR MÉDIA, PONDERAL EM MASSA (M_w), DO PNS

A análise de homogeneidade e a determinação da massa molecular média ponderal (em massa) do PNS foram realizadas em HPSEC-MALLS (cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores) (modelo DAWN DSP, Wyatt

Technologies Corporation, Santa Barbara, CA, EUA), que utiliza um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC), modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz. Foram utilizadas quatro colunas WATERS dispostas de forma seqüencial e apresentando diferentes limites de exclusão : 1×10^6 (coluna 2000); 4×10^5 (coluna 500); 8×10^4 (coluna 250) e 5×10^3 (coluna 120). O eluente, NaNO_3 0,1 M com NaN_3 a 0,02%, foi administrado na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515. Para essa análise, a amostra foi solubilizada em NaNO_3 0,1 M com NaN_3 a 0,02% na concentração 1 mg.ml^{-1} e ultrafiltrada através de membrana descartável GS de éster de celulose MILLIPORE (EUA), de porosidade $0,22 \mu\text{m}$. Para o cálculo da massa molecular, o valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com a concentração) utilizado foi de $0,135 \text{ ml.g}^{-1}$.

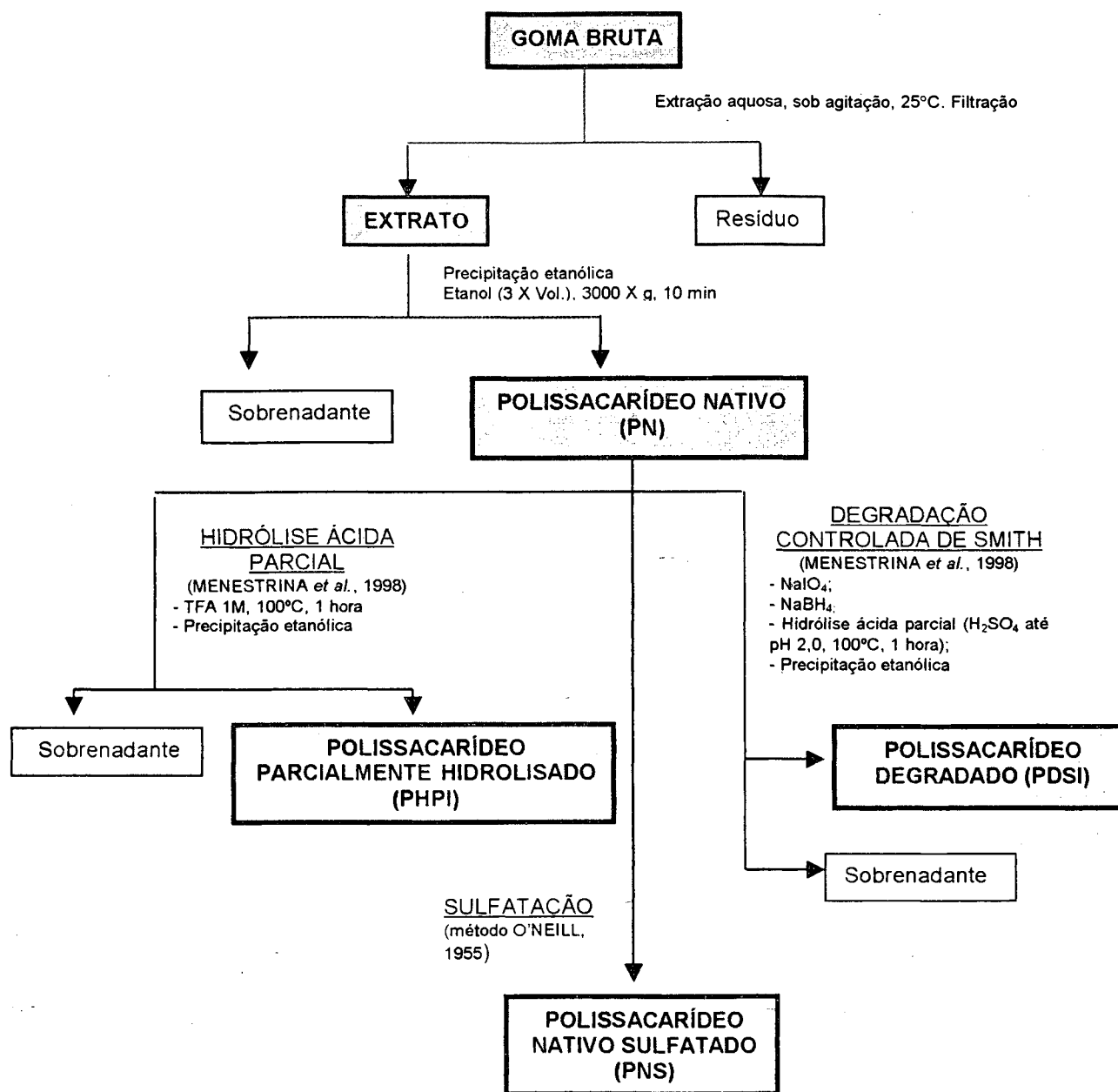


Figura 02: Esquema de obtenção do polissacarídeo nativo do exsudato de *Syagrus romanzoffiana* e de 3 derivados modificados quimicamente.

3.4 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos utilizados nos experimentos biológicos foram solubilizados em água destilada (PNS e PHPI) ou NaOH (0,5M) (PN e PDSI) na forma de soluções estoque de concentração 10 mg.ml^{-1} .

As esterilizações do PN, PHPI e PNS foram feitas por ultrafiltração através de membrana descartável de difluoreto de polivinilideno, com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$, MILLEX® (Millipore Co, MA, EUA). Quanto ao PDSI, devido à baixa solubilidade desta molécula, a esterilização foi feita sob radiação ultravioleta (U.V.) (lâmpada PHILIPS 30 W / G 30 / T 8, Long Life, Holland) durante 30 minutos.

3.4.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS

As culturas de células, após filtração (item 3.2), foram submetidas a contagens de células com a utilização de câmara de Neubauer e microscópio ótico (aumento 100 X). Alíquotas de $200 \mu\text{l}$ da suspensão de células filtrada (aproximadamente $53 \times 10^4 \text{ células.ml}^{-1}$) foram distribuídas sobre 2 ml do meio de cultura básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), na ausência de 2,4-D, contido em poços de placas de cultura medindo 2 cm de diâmetro. Ágar 0,7% (m/v), foi acrescentado para solidificar o meio de cultura e o pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Este meio de cultura foi enriquecido, ou não, com os polissacarídeos PN, PNS, PHPI e PDSI de maneira a perfazerem concentrações finais iguais a 0,1, 1, 20 e $60 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Para cada concentração foram feitas 10 repetições. Estas placas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar igual a $70 \pm 5\%$.

O número total e o número de embriões no estágio cotiledonar de desenvolvimento eventualmente formados foi contado, sob microscópio estereoscópico, em intervalos de 7 dias, durante o período de 28 dias (4 semanas)

de cultura. Após o período da cultura, o número de plântulas formadas foi contado e sendo seu comprimento total medido sob microscópio estereoscópico.

3.4.3 CRESCIMENTO VEGETAL – EFEITO SOBRE A MATÉRIA FRESCA E SECA

Ao final do período da cultura para o experimento de embriogênese somática (item 3.4.2), o material vegetal (referente aos diferentes tratamentos) foi isolado e sua massa foi determinada antes e depois de secagem em estufa, à temperatura de 65° por 24 horas, para obtenção da matéria fresca e seca, respectivamente.

3.4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico JMP ("Statistical Analysis System", SAS Institute Inc., EUA, 1989-2000) versão 4.0.0. Foram utilizados testes de análise de variância seguidos do teste "Student's" para comparação de médias. Em cada experimento foram utilizados 4 polissacarídeos em 4 concentrações, sendo que para cada concentração (tratamento) foram feitas 10 repetições. Em anexo estão apresentados os resultados estatísticos referentes aos 4 polissacarídeos testados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS NOS TESTES BIOLÓGICOS

As características químicas dos polissacarídeos utilizados neste estudo estão apresentadas na Tabela I. Nesta tabela, verifica-se que o polissacarídeo nativo (PN) apresenta xilose, arabinose, ramnose e ácidos urônicos como constituintes monossacarídicos, caracterizando-se como uma heteroxilana ácida. Os polissacarídeos resultantes de hidrólise ácida parcial (PHPI) e de degradação controlada de Smith (PDSI) apresentaram diferentes proporções de xilose:arabinose quando comparados ao PN. Os procedimentos de hidrólise ácida parcial e degradação controlada de Smith promovem a retirada dos monossacarídeos presentes nas cadeias mais laterais do PN. Como no PHPI e no PDSI a quantidade de arabinose mostrou-se significativamente reduzida quando comparada ao PN, sugere-se que grande parte destas unidades participam de cadeias laterais e terminais não redutores da molécula. Com relação à estrutura química proposta, baseada em análises de metilação (dados não apresentados) e RMN-¹³C (anexo 5), todos os polissacarídeos diferem entre si. Após o procedimento de sulfatação química do PN foi formado o polissacarídeo nativo sulfatado (PNS) com a mesma composição monossacarídica que o PN. Este procedimento adiciona grupos sulfato na molécula e provavelmente modifica a conformação estrutural e aumenta a carga líquida negativa do polissacarídeo. Com a análise do PNS por HPSEC-MALLS (cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores) (item 3.3.1.4) verifica-se um espectro característico de molécula homogênea. O índice de polidispersividade calculado foi de $1,151 \pm 1,021$, indicando a homogeneidade da molécula. Este resultado mostra que o procedimento de sulfatação não degradou o PN. A massa molecular média ponderal em massa (M_w) calculada foi de $1,484 \times 10^5$ g.mol⁻¹.

Tabela I: Aspectos estruturais relacionados com os polissacarídeos PN, PNS, PHPI e PDSI

	PN	PNS	PHPI	PDSI
Rotação específica ^a [α] _D ²⁵	-72°	nd.	nd.	-53°
M _w (g.mol ⁻¹) ^b	1,37x10 ⁵	1,48x10 ⁵	1,12x10 ⁴	nd.
Grau de substituição (D.S.) ^c	-	0,7	-	-
Proteína (mol %) ^d	2,8	nd.	nd.	nd.
Ácidos urônicos (mol %) ^e	8	nd.	8	3
Açúcares neutros (mol %) ^f				
Xilose	48	51	82	85
Arabinose	24	25	2	12
Ramnose	20	24	8	0
Proporção xilose : arabinose	2:1	2:1	41:1	7:1
Tipo de estrutura química proposta*	Heteroxilana ácida ramificada	Heteroxilana ácida sulfatada	Arabinoxilana ácida ramificada	Arabinoxilana linear

^a determinada em polarímetro RUDOLPH RES. 589; ^b determinada por cromatografia de exclusão estérica acoplada a multidetectores (HPSEC-MALLS); ^c obtido pela dosagem de grupos sulfato; ^d determinado pelo método colorimétrico de BRADFORD (1976); ^e determinado pelo método colorimétrico do metahidroxibifenil (BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN, 1973); ^f determinado por cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS) precedido por hidrólise ácida total (TFA 1M, 8 horas, 100°C), redução e acetilação; nd. não determinado; *baseados nas análises de metilação e ressonância nuclear magnética de carbono-treze (RMN-¹³C), espectros apresentados em anexo (anexo 5). Obs.: A M_w do PDSI não foi determinada porque o perfil desta molécula após análise em HPSEC-MALLS não indicou homogeneidade.

4.2 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.2.1 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CÉLULAS DE CENOURA

Experimentos preliminares para a avaliação da atividade biológica foram realizados de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.2. Os resultados referentes aos efeitos dos diferentes polissacarídeos sobre o padrão de diferenciação de células de cenoura em embriões somáticos serão apresentados separadamente. Após a primeira semana de cultivo das células, nenhum dos polissacarídeos testados apresentou efeito inibitório ou estimulatório, estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$), em relação ao controle, sobre a embriogênese somática em células de cenoura cultivadas *in vitro*, em quaisquer das concentrações testadas. A Figura 03 mostra o aspecto geral da cultura de células de cenoura após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS sólido, na ausência de polissacarídeos (grupo controle).

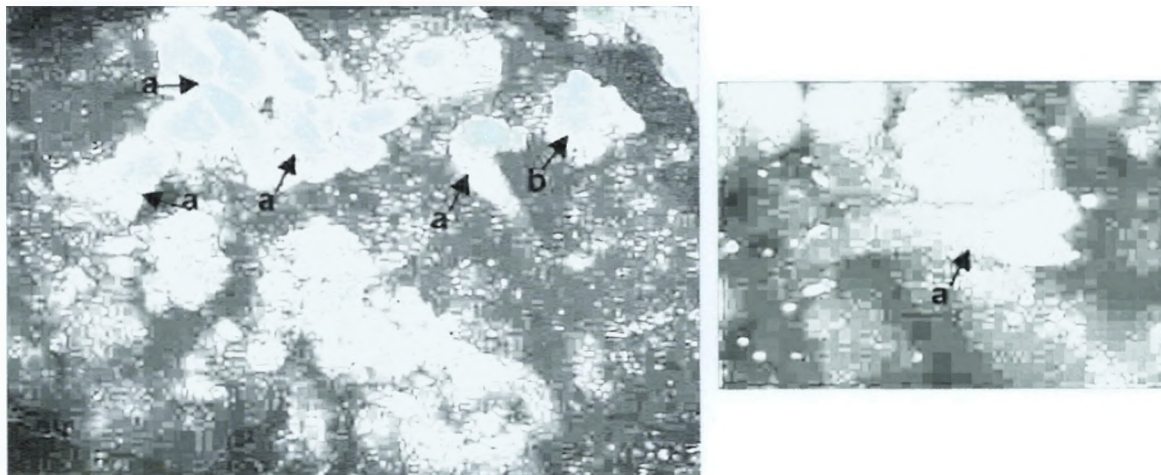


Figura 03: Aspecto geral da cultura de células de cenoura (aumento 2,87 X) após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS na ausência de 2,4-D e de polissacarídeos (grupo controle). No detalhe, um embrião no estágio cotiledonar de desenvolvimento (aumento 8,2 X). Setas indicam a presença de embriões no estágio cotiledonar (a) e grupo de células indiferenciadas (b).

4.2.1.1 Efeito do polissacarídeo nativo (PN)

A Figura 04 mostra os resultados referentes ao número total de embriões e ao número de embriões no estágio cotiledonar, quando as células de cenoura são cultivadas na presença do PN em diferentes concentrações e na ausência (controle). Pode-se verificar que durante o período de cultivo ocorreu um aumento no número total de embriões e no número de embriões no estágio cotiledonar formados tanto na presença quanto na ausência do PN (tratamento controle). Na 3ª semana de cultivo, o tratamento $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ estimulou ($p \leq 0,05$) a embriogênese somática (em 49%), porém, este efeito não permaneceu na 4ª semana. Este mesmo tratamento estimulou (em 32%) a formação de embriões no estágio cotiledonar na 4ª semana de cultivo, tendo sido este efeito estatisticamente significativo em nível de 5% de probabilidade. Através destes resultados pode-se sugerir que o PN está influenciando no padrão de diferenciação embrionário (estádio de desenvolvimento).

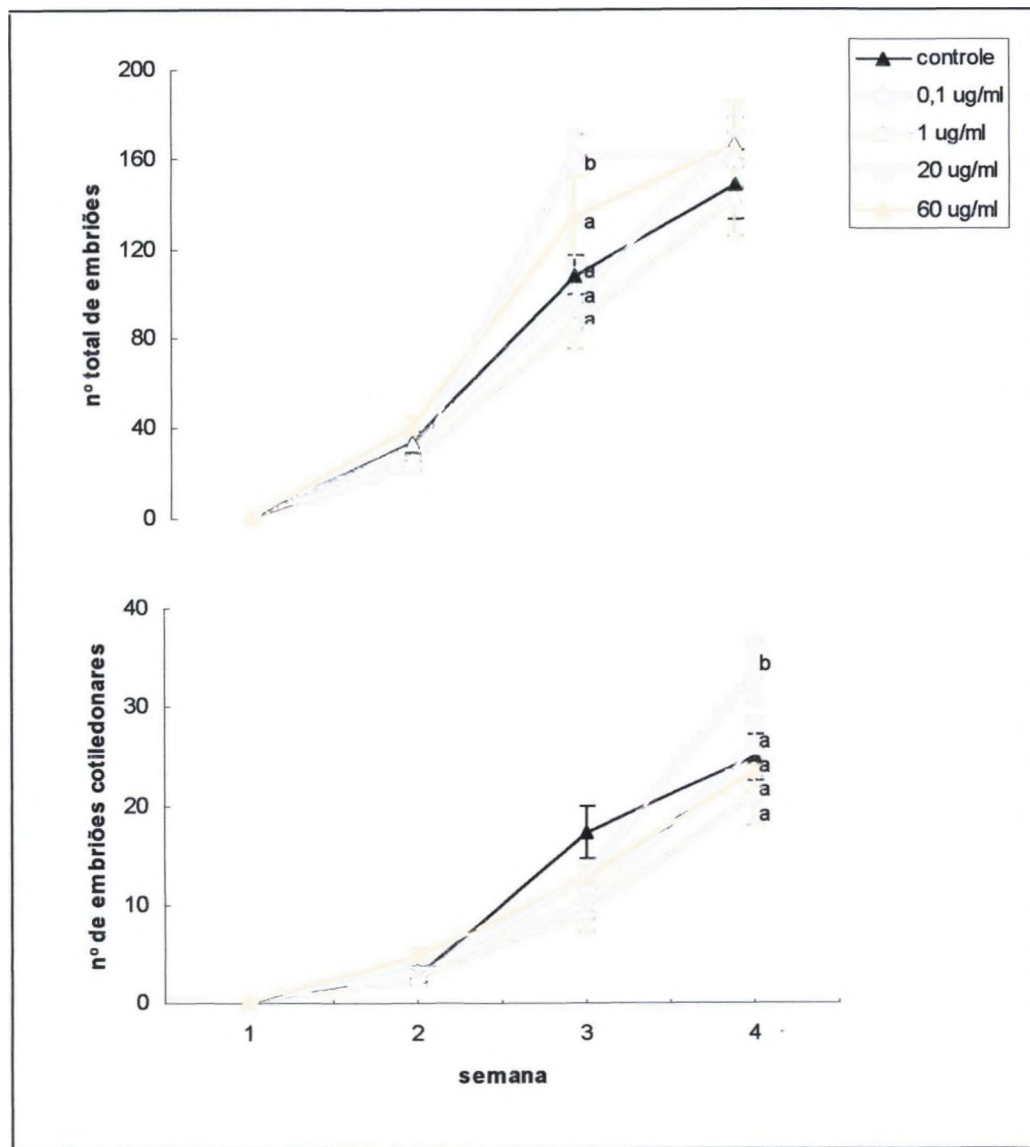


Figura 04: Efeito do PN sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%.

4.2.1.2 Efeito do polissacarídeo sulfatado (PNS)

Os resultados associados ao PNS (Figura 05) demonstram que este polissacarídeo, em todas as concentrações testadas, inibe a formação de embriões somáticos totais ao final do período da cultura. Na 2ª semana de cultivo os tratamentos 20 e 60 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ causaram uma diminuição no número total de embriões formados e o tratamento 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ estimulou a formação de embriões no estágio cotiledonar. Na última semana de cultivo foi observada uma diminuição ($p \leq 0,05$) na formação de embriões somáticos totais associada com a presença de PNS, na concentração 1 e 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, no meio de cultura, tendo sido esta redução de 33% e 46%, respectivamente. Com relação aos embriões no estágio cotiledonar, apenas o tratamento 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ inibiu significativamente ($p \leq 0,05$) sua formação ao final da 4ª semana de cultivo, tendo sido esta inibição da ordem de 48%. A Figura 06 mostra o aspecto geral da cultura após 28 dias de cultivo com tratamento de PNS (20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

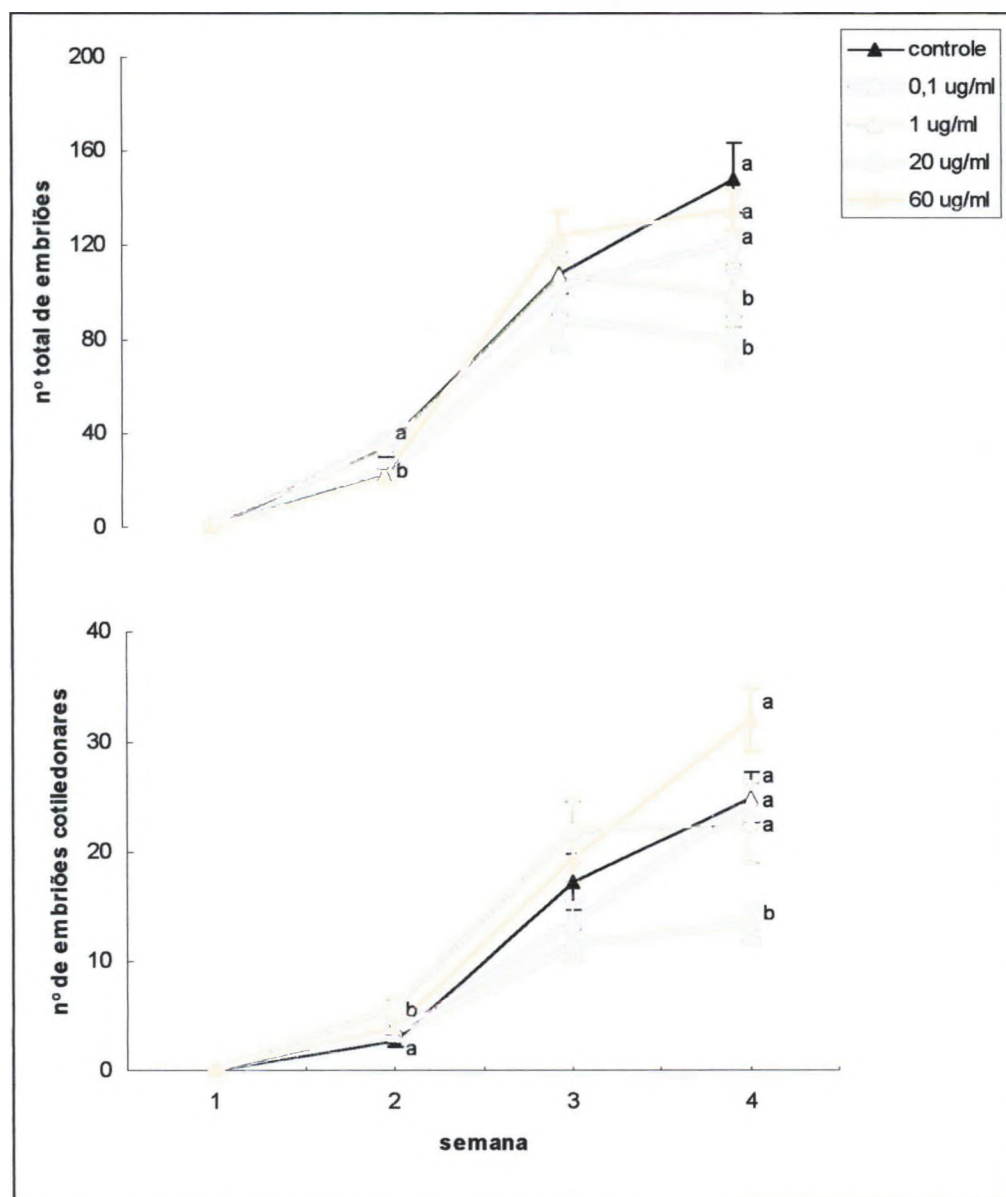


Figura 05: Efeito do PNS sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%.

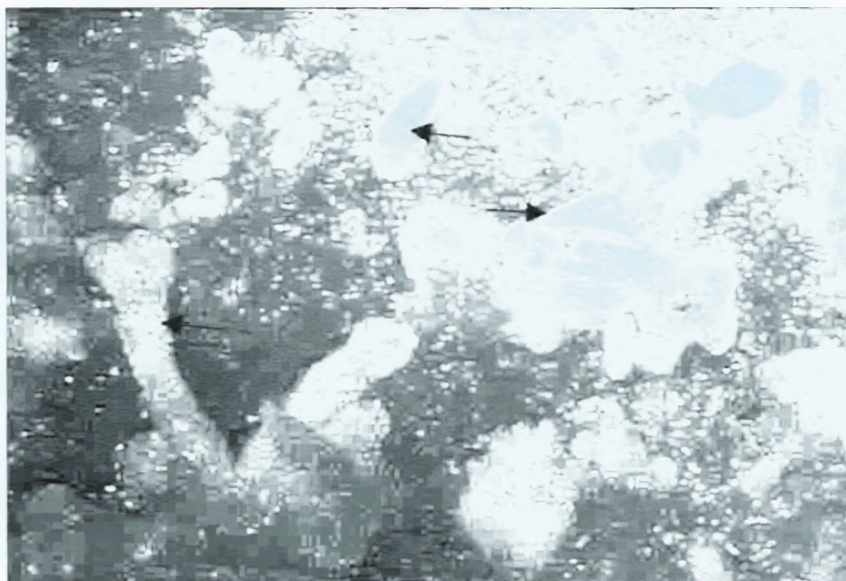


Figura 06: Aspecto geral da cultura de células de cenoura (aumento 2,87 X), após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS sólido enriquecido com PNS ($20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Setas indicam a presença de embriões no estágio cotiledonar.

4.2.1.3 Efeito do polissacarídeo hidrolisado (PHPI)

Com relação ao número total de embriões, a presença do PHPI no meio de cultura nas diferentes concentrações testadas não provocou nenhuma alteração estatisticamente significativa ao longo de todo o período de cultivo. Quanto ao número de embriões no estágio cotiledonar, o tratamento $0,1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ inibiu ($p \leq 0,05$) em 59% a formação destes, quando comparado ao controle, na 3^o semana de cultura. Porém, este efeito não permaneceu na 4^o semana (Figura 07). Assim, no final do período de cultivo, o PHPI não apresentou nenhum efeito sobre o número total de embriões e sobre o número de embriões no estágio cotiledonar.

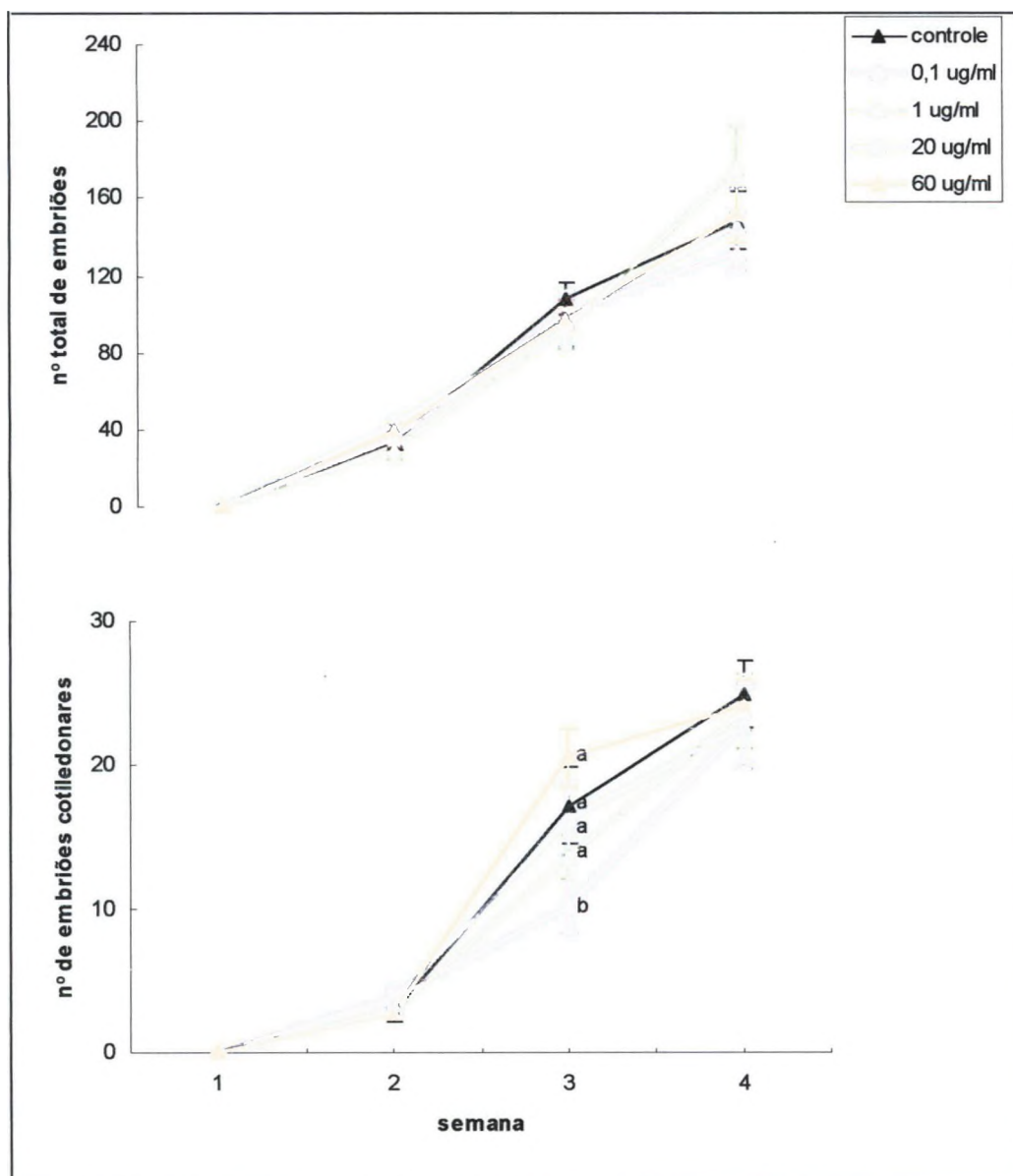


Figura 07: Efeito do PHPI sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%.

4.2.1.4 Efeito do polissacarídeo degradado (PDSI)

Os gráficos referentes aos resultados relacionados ao PDSI estão apresentados na Figura 08. Durante a 3ª e 4ª semana de cultivo, observa-se um aumento no número total de embriões somáticos formados na presença do PDSI. Porém, este aumento foi significativo (em nível de $p \leq 0,05$) apenas para o tratamento $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (3ª semana – 57% de estímulo) e $60 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (4ª semana – 68% de estímulo). O efeito estimulatório do tratamento $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ não foi encontrado na 4ª semana. Com relação aos embriões no estágio cotiledonar, os tratamentos 20 e $60 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ estimularam sua formação. O efeito do tratamento $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ foi estatisticamente significativo apenas na 2ª semana de cultivo. O tratamento $60 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ estimulou a formação de embriões no estágio cotiledonar em 84% ($p \leq 0,05$), ao final do período da cultura. A Figura 09 mostra o aspecto geral da cultura após 28 dias de cultivo, na presença do PDSI ($60 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Os resultados obtidos sugerem que a atividade do PDSI está relacionada com a formação de embriões totais (sem diferenciação por estágio de desenvolvimento) e com a formação de embriões no estágio cotiledonar.

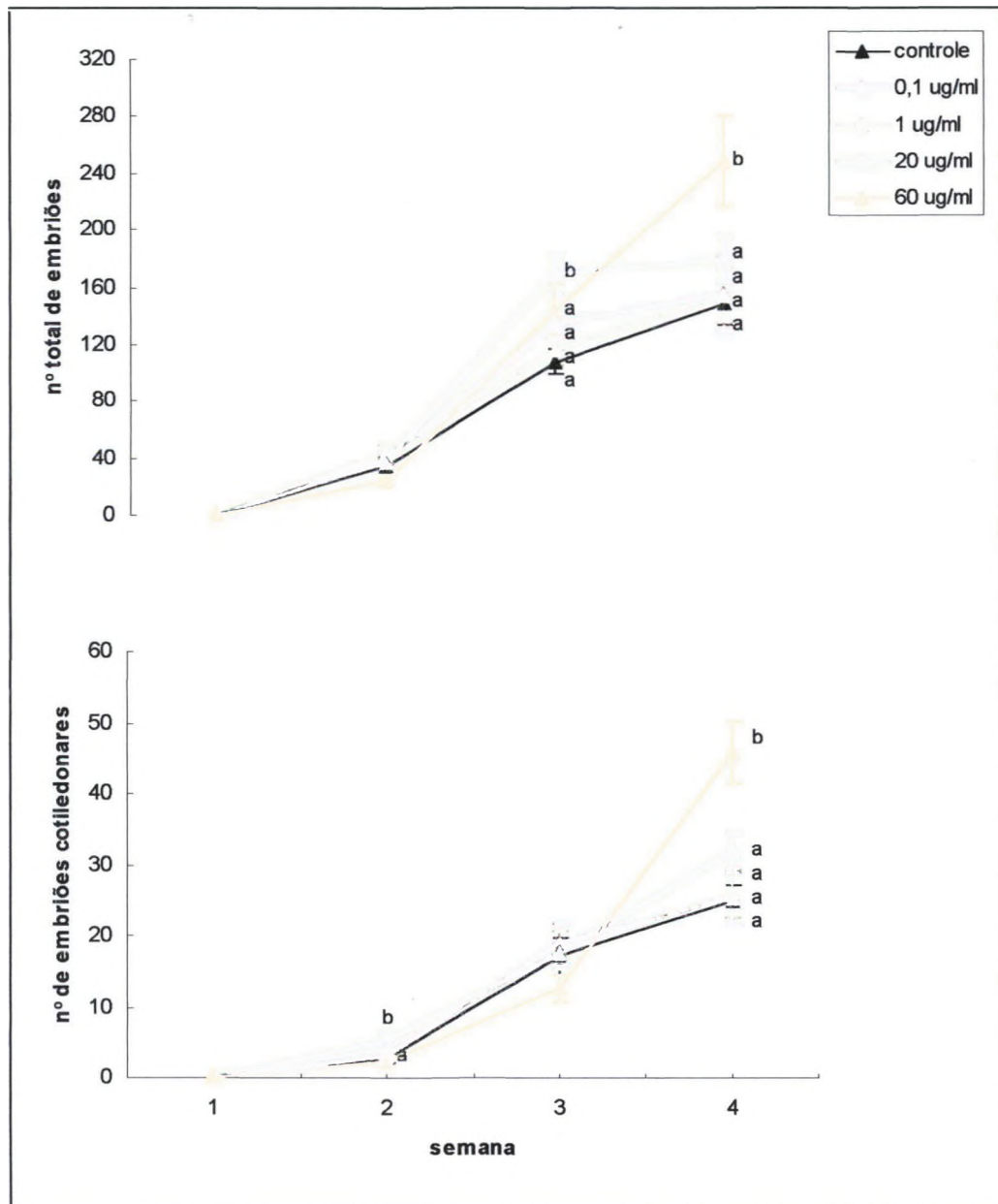


Figura 08: Efeito do PDSI sobre o número total de embriões somáticos (acima) e número de embriões no estágio cotiledonar (abaixo) formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. As barras verticais indicam o erro padrão; símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%.



Figura 09: Aspecto geral da cultura de células de cenoura (aumento 2,87 X), após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS sólido enriquecido com PDSI ($60 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Setas indicam a presença de embriões no estágio cotiledonar.

A atividade dos diferentes polissacarídeos sobre o número total de embriões e sobre o número de embriões no estágio cotiledonar formados, ao final do período de cultivo (4^o semana), encontram-se resumidas na Tabela II.

Tabela II: Efeito dos polissacarídeos PN, PNS, PHPI e PDSI sobre o número total e o número de embriões no estágio cotiledonar formados a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*, ao final do período de cultivo (4^o semana).

Polissacarídeos	[$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] ^a	Embriões Totais	Embriões no estágio cotiledonar
PN	0,1	C	E
	1	C	C
	20	C	C
	60	C	C
PNS	0,1	C	C
	1	I	C
	20	I	I
	60	C	C
PHPI	0,1	C	C
	1	C	C
	20	C	C
	60	C	C
PDSI	0,1	C	C
	1	C	C
	20	C	C
	60	E	E

^a Refere-se às concentrações de polissacarídeo testadas; C: igual ao grupo controle; E: estimulou ($p \leq 0,05$); I: inibiu ($p \leq 0,05$).

O PN e o PNS possuem a mesma composição monossacarídica (Tabela I), porém o PNS tem, na sua estrutura, substituições por grupamentos sulfato. Comparando-se os resultados obtidos para o PN e o PNS, pode-se sugerir que a adição de grupos sulfato provocou alterações na molécula do PNS suficientes para modificar o efeito fisiológico encontrado para o PN. O PNS causou inibição de embriogênese somática, efeito este não encontrado para o PN. Essas alterações podem ocorrer a nível conformacional da molécula, já que o grupo sulfato é um

grupamento carregado negativamente que induz mudanças conformacionais no polissacarídeo.

Comparando-se a estrutura do PN com a do PHPI verifica-se que as duas moléculas são ramificadas e possuem o mesmo teor de ácidos urônicos, porém, o PHPI apresenta menor quantidade de ramnose e maior quantidade de xilose quando comparado ao PN. O PN estimulou a formação de embriões no estágio cotiledonar mas este efeito não foi observado com relação ao PHPI, onde nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada. Este resultado sugere que as unidades de ramnose podem estar desempenhando um importante papel na atividade do PN, já que com o PHPI não foi verificado o mesmo efeito.

Comparando-se a estrutura do PDSI com a do PN, verificam-se diferenças com relação à composição monossacarídica (Tabela I) e à estrutura química (Anexo 5). Quando comparam-se as estruturas do PDSI com a do PHPI, observa-se que a quantidade de xilose encontrada nas duas moléculas é praticamente a mesma (Tabela I), mas a estrutura química é muito diferente de acordo com as análises por RMN-¹³C (Anexo 5). O PN e o PHPI são moléculas ramificadas e têm caráter mais ácido que o PDSI. Este polissacarídeo caracteriza-se como um arabinoxilana linear, com a cadeia principal mais exposta já que não possui ramificações. Dessa forma, pode-se sugerir que a atividade biológica encontrada se deve, não apenas à composição monossacarídica da molécula mas, principalmente, à sua estrutura e conformação, já que as estruturas mais ramificadas (PN e PHPI) não causaram o mesmo efeito fisiológico apresentado com o PDSI.

4.2.2 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS

O PN e o PNS, na concentração $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, inibiram significativamente ($p \leq 0,05$) a formação das plântulas, ao final do período de cultivo (Figuras 10 e 11, respectivamente), tendo sido esta inibição da ordem de 86% e 77%, respectivamente. A conversão dos embriões somáticos formados em plântulas, não sofreu alterações estatisticamente significativas em função da presença dos polissacarídeos PHPI e PDSI no meio de cultura, em quaisquer das concentrações testadas. (Figuras 12 e 13, respectivamente). Apesar da inibição da formação de plântulas ao final do período de cultura (4ª semana) ser estatisticamente significativa apenas para o PN e o PNS, em baixas concentrações, o PDSI também apresentou a mesma tendência. Com relação ao PHPI, a concentração $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ não causou grande redução no número de plântulas, como foi observado para os outros polissacarídeos

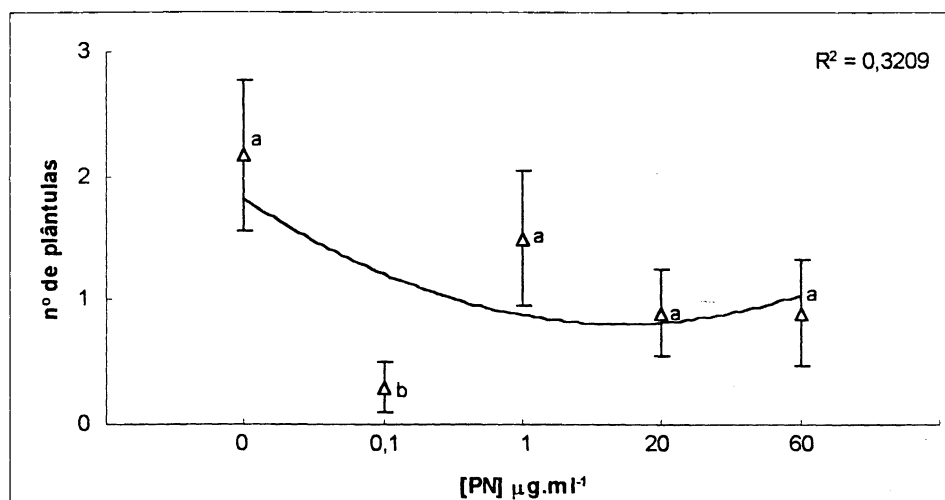


Figura 10: Efeito do PN sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1386x^2 - 1,0254x + 2,706$.

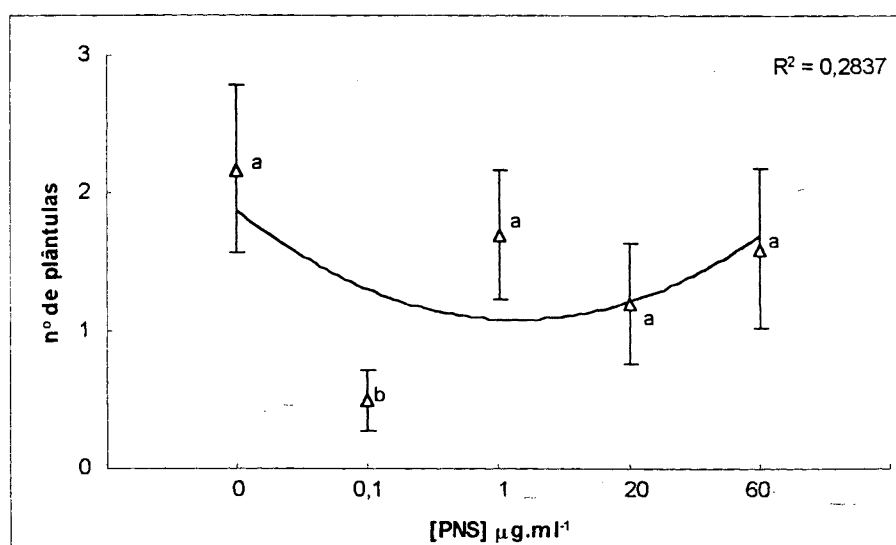


Figura 11: Efeito do PNS sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1743x^2 - 1,0897x + 2,786$.

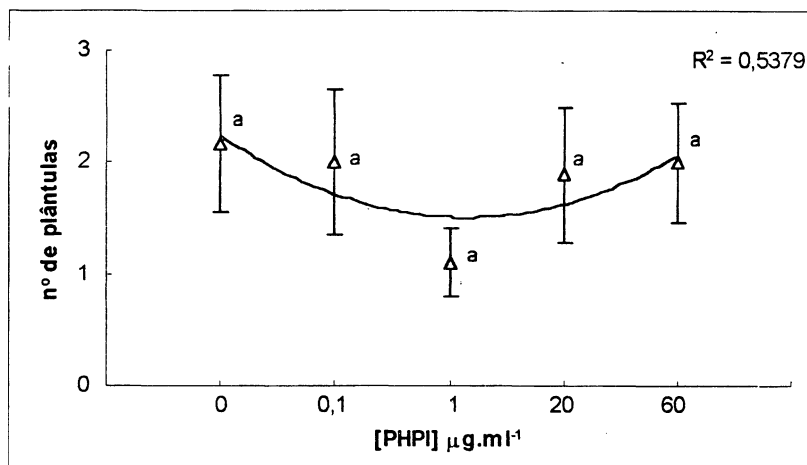


Figura 12: Efeito do PHPI sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1607x^2 - 1,0093x + 3,092$.

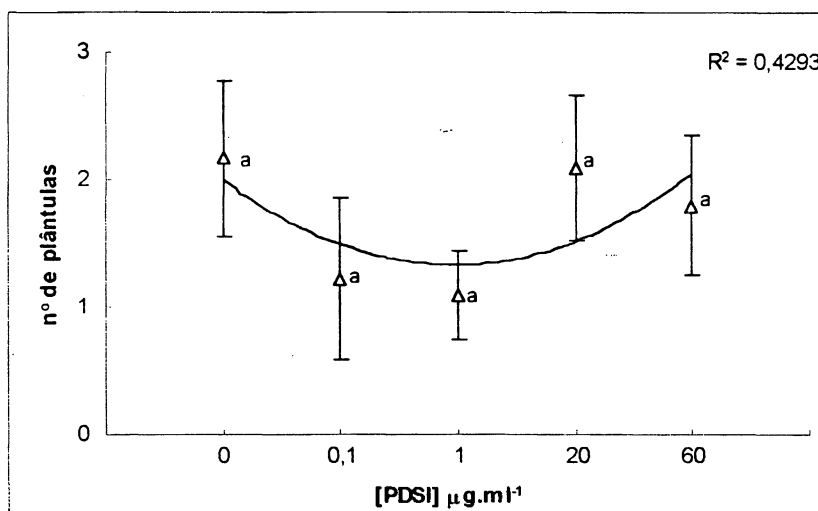


Figura 13: Efeito do PDSI sobre o número de plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1729x^2 - 1,0231x + 2,846$.

Quanto ao comprimento das plântulas formadas, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada nas plântulas cultivadas com os polissacarídeos nas diferentes concentrações testadas. A presença do PN, na concentração $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, inibiu o crescimento das plântulas, concentrações maiores não provocaram tal efeito (Figura 14). Com relação ao PNS e ao PHPI, o tratamento $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ causou a formação de plântulas maiores do que aquelas formadas no grupo controle, porém, concentrações maiores inibiram o crescimento das plântulas formadas (Figuras 15 e 16, respectivamente). Ocorreu uma redução no comprimento total das plântulas associada com presença do PDSI no meio de cultura, em todas as concentrações testadas, tendo sido a inibição do alongamento concentração-dependente (Figura 17). Embora a curva ajustada aos dados tenha indicado evidência clara de que a dependência entre o comprimento das plântulas e a concentração do polissacarídeo no meio de cultura é do tipo exponencial negativa, nenhuma alteração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi encontrada para o parâmetro avaliado. A Tabela III mostra resumidamente os dados referentes ao efeito dos polissacarídeos testados, nas diferentes concentrações, sobre o número de plântulas e o comprimento total das plântulas formadas.

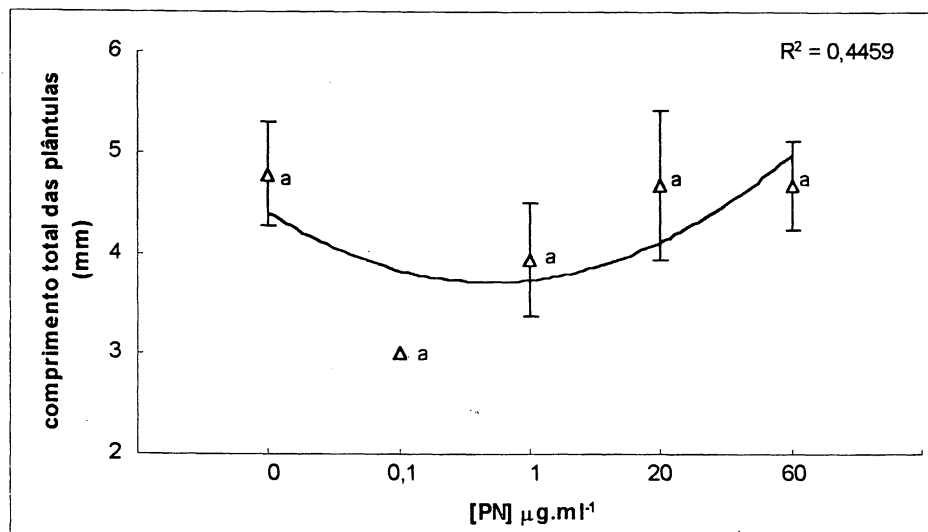


Figura 14: Efeito do PN sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,2407x^2 - 1,2993x + 5,46$.

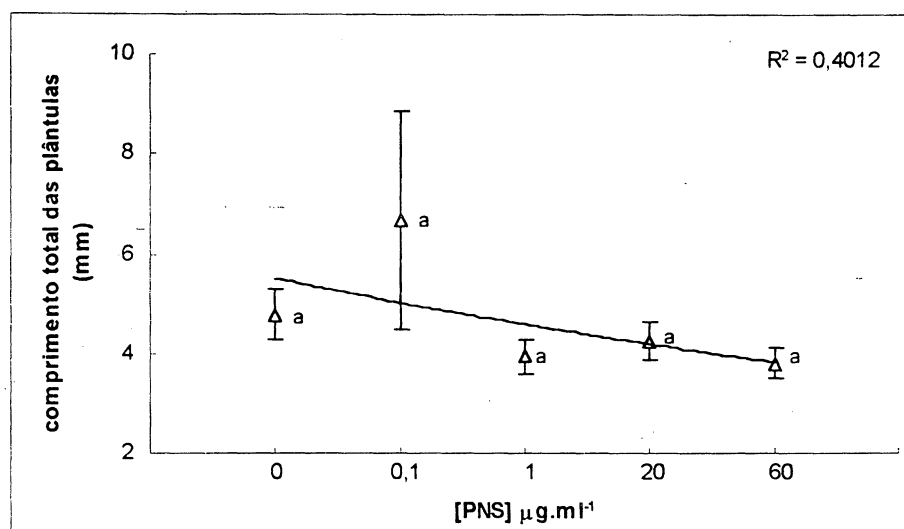


Figura 15: Efeito do PNS sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 6,0249 e^{-0,091x}$.

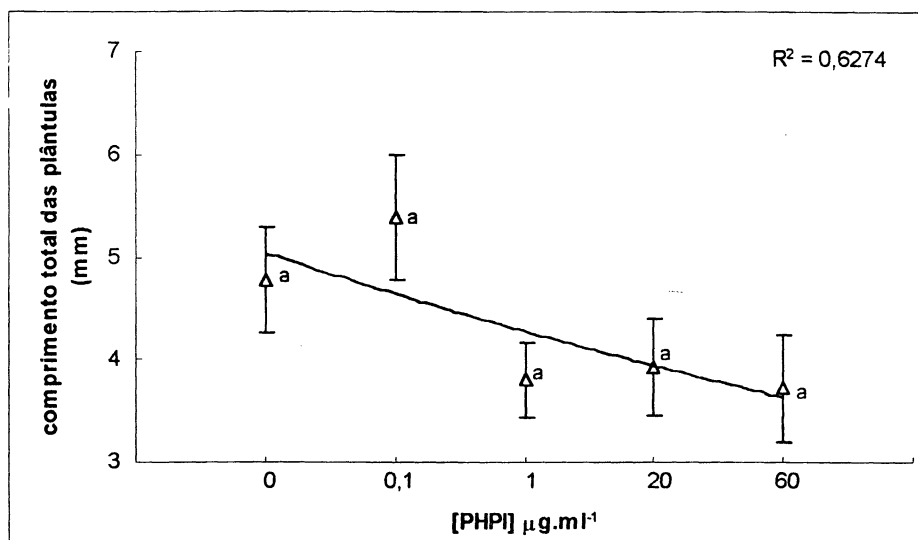


Figura 16: Efeito do PHPI sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 5,4656 e^{-0,0817x}$.

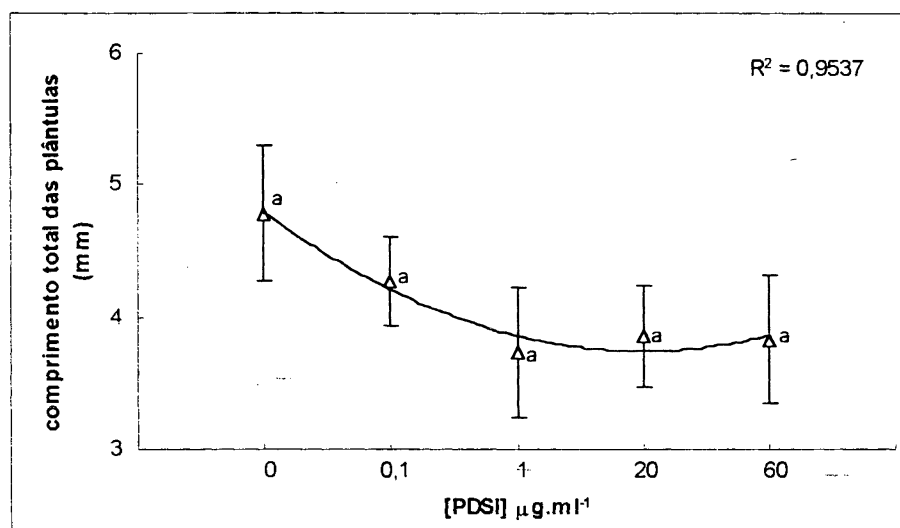


Figura 17: Efeito do PDSI sobre o comprimento total das plântulas formadas após 28 dias de cultivo. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equação de regressão: $y = 0,1164x^2 - 0,9296x + 5,602$.

Tabela III: Efeito do PN, PNS, PHPI e PDSI sobre o número de plântulas e sobre o comprimento total das plântulas formadas ao final do período de cultivo (4º semana).

Polissacarídeo	[$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] ^a	Número de plântulas	Comprimento total das plântulas
PN	0,1	I	C
	1	C	C
	20	C	C
	60	C	C
PNS	0,1	I	C
	1	C	C
	20	C	C
	60	C	C
PHPI	0,1	C	C
	1	C	C
	20	C	C
	60	C	C
PDSI	0,1	C	C
	1	C	C
	20	C	C
	60	C	C

^a Referente às concentrações de polissacarídeo utilizadas; C: igual ao grupo controle; I: inibiu ($p \leq 0,05$).

A partir dos dados observados na Tabela III, pode-se verificar que o PN e o PNS apresentaram efeito inibitório na formação de plântulas. A presença do grupo sulfato na estrutura do polissacarídeo parece não influenciar diretamente na formação de plântulas, já que tanto o PNS quanto o PN inibiram significativamente a formação destas. Talvez as unidades de ramnose sejam importantes para esta atividade uma vez que este monossacarídeo está presente em grande quantidade apenas no PN e PNS. O PDSI estimulou a formação de embriões somáticos porém não estimulou a formação de plântulas, o que pode sugerir que o processo de

formação de embriões e o processo de formação de plântulas ocorre através de mecanismos diferentes. Através dos gráficos obtidos pode-se sugerir que os polissacarídeos testados, especialmente o PN e o PNS, estão interferindo no processo de desenvolvimento do embrião em plântulas, principalmente em baixas concentrações.

4.2.3 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE O CRESCIMENTO VEGETAL - MATÉRIA FRESCA E MATÉRIA SECA

Nenhuma alteração significativa ($p \leq 0,05$) foi observada para a matéria fresca de células, embriões e plântulas, crescidas na presença dos polissacarídeos. Foi observada uma clara tendência de aumento no acúmulo de matéria fresca relacionada com a presença do PN e PDSI no meio de cultura (Figuras 18 e 21, respectivamente). Este aumento foi concentração-dependente. Para o PDSI este aumento equivale ao aumento concentração-dependente do número de embriões no estágio cotiledonar. A presença do PHPI no meio de cultura não provocou alterações no acúmulo de matéria fresca (Figura 20). Com relação ao PNS, foi observado um aumento no acúmulo de matéria fresca com tratamento $60 \mu\text{g.ml}^{-1}$ quando comparado às outras concentrações testadas (Figura 19). Este aumento de massa foi devido ao maior número de embriões na fase cotiledonar associado apenas a este tratamento. As células diferenciadas são grandes, possuem citoplasma pouco denso e com grandes vacúolos preenchidos principalmente com água (GUERRA *et al.*, 1999). Dessa maneira, como foi observado nos resultados obtidos, quanto mais diferenciadas estão as células, maior a quantidade de matéria fresca encontrada.

A presença dos polissacarídeos no meio de cultura resultou em redução de matéria seca, quando comparado ao controle, em todas as concentrações testadas. O PN ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$), PNS (1 e $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$), PHPI ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) e PDSI ($0,1$, 1 , 20 e $60 \mu\text{g.ml}^{-1}$) causaram uma redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) de matéria seca, quando comparado ao controle (Figuras 18, 19, 20, e 21, respectivamente). Comparando-se o efeito das diferentes concentrações de polissacarídeo testadas, observa-se que concentrações acima de $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ não causaram inibição do

acúmulo de matéria seca além da inibição causada por $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, indicando que com este tratamento ocorre a redução máxima. O PDSI apresenta resultados significativos ($p \leq 0,05$) para todas as concentrações testadas, este fato pode ser devido à grande formação de embriões a partir de células embriogênicas. As células embriogênicas são indiferenciadas, totipotentes, possuem citoplasma denso e vacúolos pequenos, dessa maneira, apresentam maior quantidade de matéria do que as células diferenciadas (GUERRA *et. al.*, 1999).

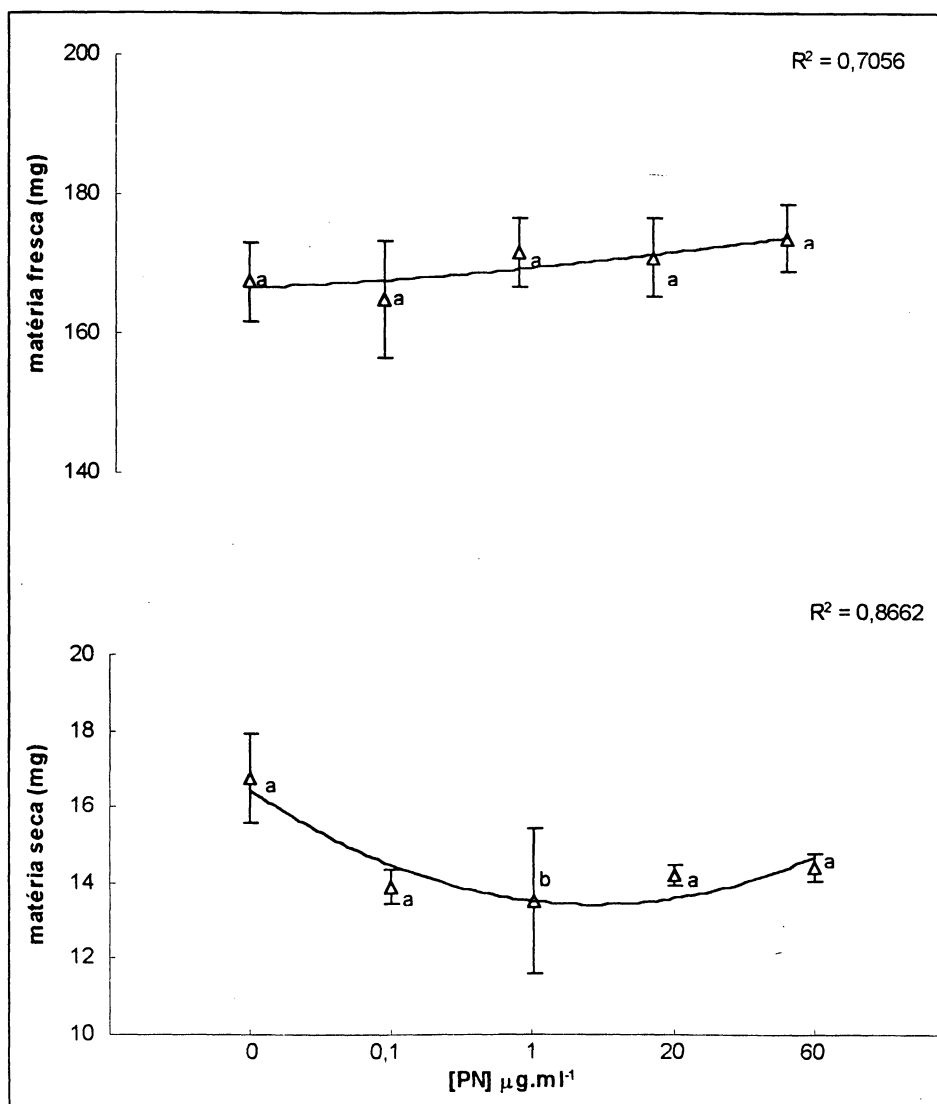


Figura 18: Efeito do PN sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = 0,25x^2 + 0,33x + 165,96$ (matéria fresca) e $y = 0,5143x^2 - 3,5257x + 19,47$ (matéria seca).

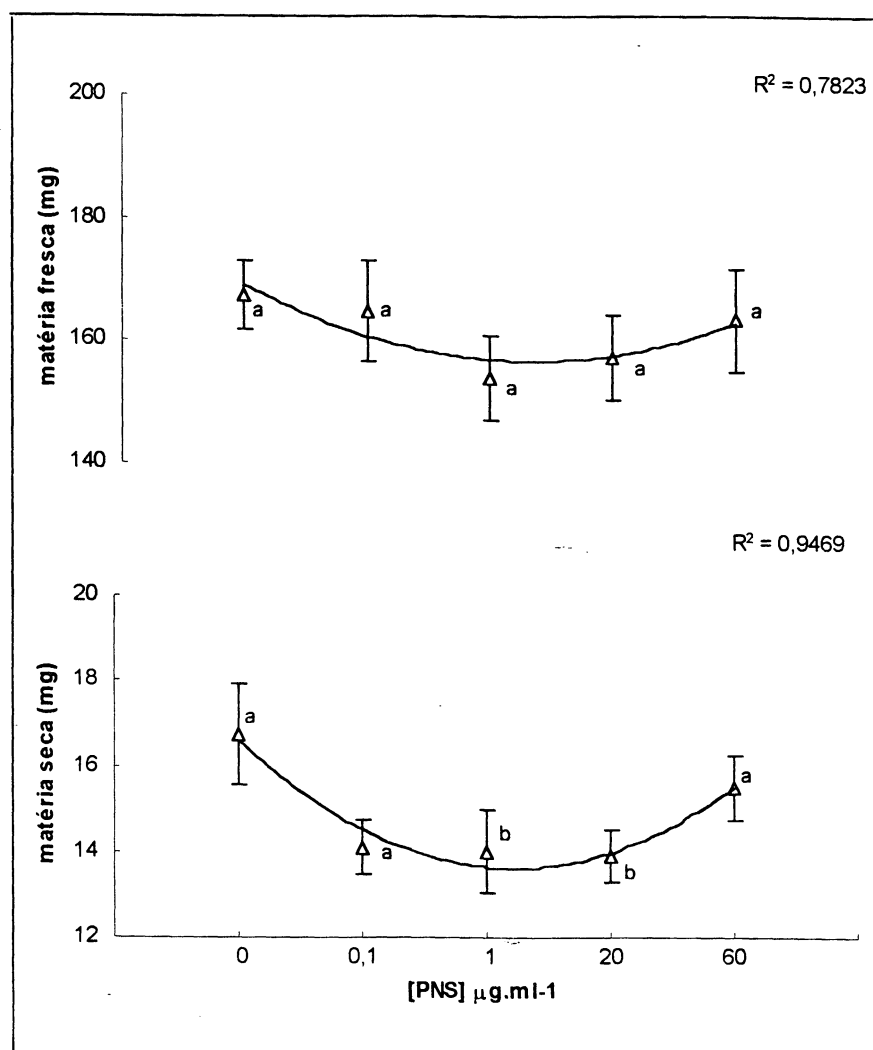


Figura 19: Efeito do PNS sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = 2,2571x^2 - 15,143x + 181,93$ (matéria fresca) e $y = 0,6071x^2 - 3,9129x + 19,91$ (matéria seca).

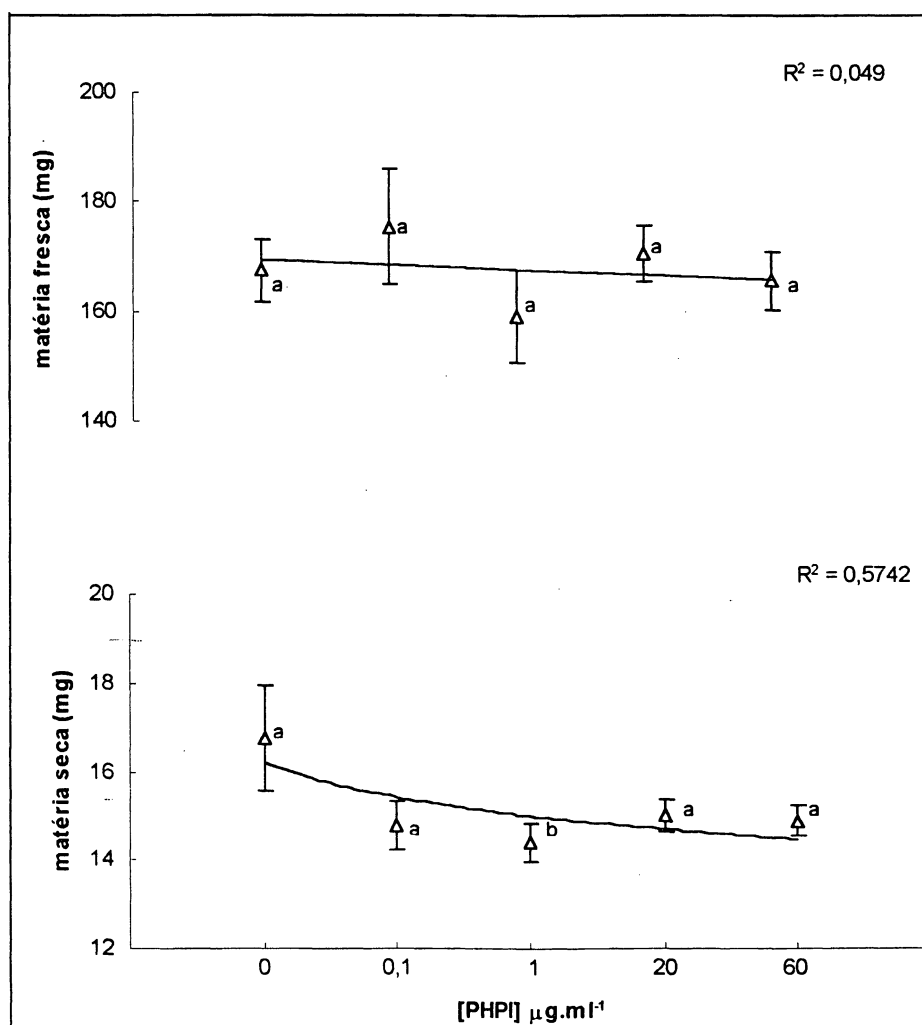


Figura 20: Efeito do PHPI sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = -0,854x + 170,21$ (matéria fresca) e $y = 16,191x^{-0,0695}$ (matéria seca).

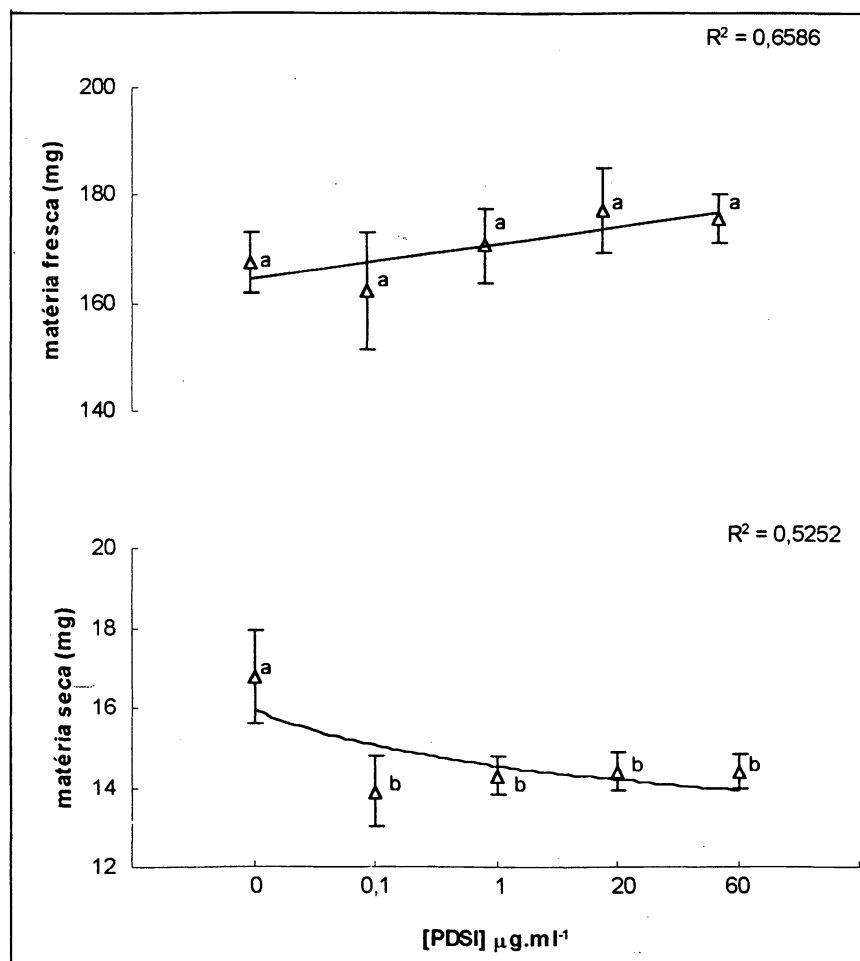


Figura 21: Efeito do PDSI sobre a matéria fresca (acima) e seca (abaixo) do conteúdo celular após 28 dias de cultura. As barras verticais representam o erro padrão; Símbolos seguidos da mesma letra representam médias que não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade. Equações de regressão: $y = 3,129x + 161,2$ (matéria fresca) e $y = 15,952x^{-0,0843}$ (matéria seca).

4.3 DISCUSSÃO GERAL

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar um possível envolvimento de polissacarídeos de parede celular vegetal, proteoglicanas ligadas a membrana celular e polissacarídeos de matriz extracelular sobre o crescimento e o desenvolvimento vegetal. A parede celular, um compartimento composto principalmente por polissacarídeos (90% da parede primária), proteínas e compostos fenólicos, é importante para o desenvolvimento vegetal porque exerce um papel essencial nas interações: (a) das células com o ambiente onde ela se encontra; (b) entre diferentes células, tecidos e órgãos e; (c) no processo de crescimento e diferenciação da célula (SATO, 1998).

As arabinoxilanas ácidas estão entre os componentes hemicelulósicos mais abundantes da parede celular vegetal. Os polissacarídeos aqui estudados possuem uma cadeia principal de unidades de xilose unidas por ligação do tipo β (1 \rightarrow 4), com cadeias laterais de arabinose, ácido urônico e/ou ramnose. No caso do PN, a cadeia principal de xilose é altamente substituída por unidades de arabinose, ramnose, ácido urônico e xilose e sua estrutura é bastante ramificada, caracterizando-se como uma heteroxilana ácida. O PNS apresenta a mesma estrutura que o PN, porém com substituição por grupamentos sulfato. Para caracterização da estrutura química fina desta molécula, análise de metilação e RMN- ^{13}C devem ser realizadas. O PHPI apresenta xilose como seu componente majoritário e tem uma estrutura complexa, com ramificações principalmente de xilose, nesta molécula a quantidade de ramnose é bem menor quando comparada ao PN. Com relação ao PDSI, ele tem uma estrutura bem mais simples que o PN e o PHPI, apresenta uma cadeia linear de unidades de xilose (cadeia principal), com algumas unidades substituídas em C-2 por arabinose ou xilose, caracterizando-se como uma arabinoxilana ácida linear.

Através dos resultados preliminares encontrados neste trabalho, sugere-se que a presença de grupos sulfato no polissacarídeo (PNS) inibe ($p \leq 0,05$) a formação de embriões somáticos a partir de células de cenoura cultivadas *in vitro*. O desenvolvimento dos embriões até o estágio cotiledonar foi também inibido na presença do PNS (1 e 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Isto pode ser sugerido já que o PN antes do procedimento de sulfatação química não apresentou o mesmo efeito biológico.

Resultados como este já foram encontrados por PEREIRA-NETTO *et. al.* (1999) quando estudaram o efeito de uma AGP sulfatada quimicamente, porém o mecanismo pelo qual ocorre esta inibição ainda não está elucidado. Tanto o PN como o PNS inibiram significativamente ($p \leq 0,05$) a formação de plântulas, sugerindo que esta atividade não está apenas relacionada com a presença de grupos sulfato. Com relação ao PHPI, ele não causou nenhuma diferença significativa ($p \leq 0,05$) no número total e no número de embriões no estágio cotiledonar formados, quando comparado ao controle, ao final do período de cultivo. O PHPI possui uma estrutura altamente ramificada mas apresenta poucas unidades de ramnose quando comparado ao PN, o que pode sugerir que as unidades de ramnose desempenham um importante papel na atividade do PN, já que com a suplementação com este polissacarídeo ocorreu uma estimulação na formação de embriões no estágio cotiledonar. Na presença do PDSI, ocorreu uma estimulação ($p \leq 0,05$) tanto na formação de embriões somáticos totais quanto na formação de embriões no estágio cotiledonar, tendo sido esta estimulação concentração-dependente. O PDSI tem uma estrutura diferente daquela encontrada para o PN, ele possui uma cadeia linear e caracteriza-se como uma arabinoxilana menos ácida do que o PN. Apesar do PDSI ter apresentado atividade estimulatória na formação de embriões somáticos, esta atividade foi inibitória para formação de plântulas, o que pode sugerir que os processos de formação de embriões e de plântulas ocorrem de maneira independente.

O mecanismo de ação pelo qual estas moléculas atuam não é conhecido. Alguns autores sugerem que algumas moléculas suplementadas exogeneamente podem se associar à parede celular, alterando a sua composição e influenciando na sinalização entre as células, resultando em um novo padrão de diferenciação celular (KREUGER e VAN HOLST, 1996). Talvez os polissacarídeos aqui utilizados estejam influenciando o padrão de diferenciação dos embriões através de eventos envolvidos com a parede e a matriz extracelular, interferindo nos processos de reconhecimento e sinalização entre as células.

Muitos estudos mostram que a suplementação exógena de polissacarídeos característicos de parede celular pode ativar celulasas e outras enzimas sendo que a ação destas enzimas pode produzir oligossacarídeos que funcionam como

moléculas sinalizadoras (oligossacarinas), como é o caso das xiloglucanas, que são componentes hemicelulósicos abundantes. Oligossacarídeos de xiloglucanas podem atuar como sinalizadores no processo de desenvolvimento vegetal através de receptores de membrana altamente específicos (McDOUGALL e FRY, 1988; VARGAS-RECHIA *et al.*, 1998). Assim como as xiloglucanas, os polissacarídeos utilizados neste trabalho podem estar atuando como substrato para enzimas produtoras de oligossacarinas. Neste caso, a conformação do polissacarídeo é importante. O PN possui grande quantidade de ramificações o que dificulta a ação da enzima, já o PDSI possui a cadeia linear com os sítios de ligação para a enzima mais abertos onde ela pode atuar melhor, produzindo oligossacarinas sinalizadoras que estimulam os processos de desenvolvimento e diferenciação dos embriões somáticos. O PN pode estar funcionando como substrato para alguma enzima péctica, já que na sua composição monossacarídica ele apresenta grande quantidade de ramnose, monossacarídeo comum nas pectinas da parede celular vegetal. As oligossacarinas produzidas pelas diferentes enzimas podem atuar em receptores de membrana e influenciar no padrão de diferenciação celular. Este mecanismo de ação foi proposto para AGPs. Este tipo de atividade não depende apenas da presença do polissacarídeo, mas também do tipo de enzima presente na parede celular (diferentes enzimas podem formar diferentes oligossacarinas) e da presença de receptores específicos para estas moléculas (KREUGER e VAN HOLST, 1996).

Neste trabalho foram sugeridas relações entre a estrutura química dos polissacarídeos e o efeito fisiológico observado sobre as células de cenoura crescidas na presença destes. Estudos mais específicos podem ser realizados futuramente para se conhecer o local e o mecanismo pelo qual estas moléculas atuam influenciando o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Experimentos como marcação radioativa dos polissacarídeos testados e posterior análise das células vegetais (tratadas com os mesmos), sob microscopia eletrônica, podem ser realizados com o objetivo de observar o local onde estas moléculas estão atuando.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Através do processo de sulfatação química do PN, obteve-se um polissacarídeo sulfatado (PNS) com grau de sulfatação (D.S.) igual a 0,7. O PNS apresenta-se constituído por xilose, arabinose e ramnose na razão molar de 51:25:24, similar à composição monossacarídica do PN. A análise deste polissacarídeo por HPSEC-MALLS mostrou um perfil homogêneo, indicando que o procedimento de sulfatação não degradou a molécula. A massa molecular média calculada para o PNS foi de $1,48 \times 10^5$;
- O PN ($0,1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) inibe significativamente ($p \leq 0,05$) a conversão dos embriões somáticos formados em plântulas;
- O PNS (1 e $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) apresenta atividade inibitória ($p \leq 0,05$) sobre a formação de embriões somáticos embora o polissacarídeo não tenha apresentado efeito inibitório dependente da concentração, especialmente com relação a formação de embriões no estágio cotiledonar;
- A presença do PDSI ($60 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) no meio de cultura estimula a embriogênese somática ($p \leq 0,05$), aumentando tanto o número total como o número de embriões no estágio cotiledonar formados, demonstrando que esta molécula apresenta efeito modulador positivo sobre o processo de diferenciação em células vegetais;
- Com relação ao comprimento das plântulas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na presença dos polissacarídeos testados, porém verifica-se uma clara tendência de inibição do alongamento das plântulas crescidas no meio de cultura com PDSI, sendo este efeito dependente da concentração;
- Embora os polissacarídeos testados não tenham apresentado nenhuma diferença estatisticamente significativa sobre o acúmulo de matéria fresca, a presença do PN e do PDSI no meio de cultura causaram um aumento da matéria fresca, sendo este aumento concentração-dependente;
- Todos os polissacarídeos, em quaisquer das concentrações testadas, causaram uma redução da matéria seca acumulada. O PN ($1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), PHPI ($1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e PDSI ($0,1$, 1 , 20 e $60 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) reduziram significativamente ($p \leq 0,05$) o acúmulo de

matéria seca, sendo que esta redução é máxima em baixas concentrações e se mantém constante em concentrações mais altas destes polissacarídeos;

- Diferentes aspectos da estrutura química do polissacarídeo, como presença de grupos sulfato, composição monossacarídica e conformação da cadeia (linear ou ramificada) parecem influenciar no efeito fisiológico relacionado com estas moléculas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CLARKE A.E., ANDERSON R.L., STONE B.A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry**, v. 18, p. 521-540, 1979.

DINAND, E.; EXCOFFIER, G.; LIÉNART, Y.; VIGNON, M.R. Two rhamnogalacturonide tetrasaccharides isolated from semi-retted flax fibers are signaling molecules in *Rubus fruticosus* L. cells. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 793-801, 1997.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-109, 1962.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z. A.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydr. Res.**, v. 282, n. 1, p. 325-333, 1996.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. Em: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 2, EMBRAPA-CNPQ, p. 533-568, 1999.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 13(2), p. 196-223, 2001.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIMURA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K. e FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures. Physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cell. And Dev. Biol.**, v. 28, p. 11-14, 1992.

KREUGER, M.; VAN HOLST, G-J. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. **Planta**, v. 189, p. 243-248, 1993.

KREUGER M, POSTMA E, BROUWER Y, VAN-HOLST GJ. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium. **Physiol Plant**, v. 94, p. 605-612, 1995.

KREUGER, M.; VAN HOLST, G-J. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. **Plant Mol. Biol.**, v. 30, p. 1077-1086, 1996.

MAJEWSKA-SAWKA A, NOTHNAGEL EA. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. **Plant Physiol**, v. 122, p.3-9, 2000.

McDOUGALL, G. J.; 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.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; WILLIAMS, E. G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: BHOJWANI, S. S. (Ed.) **Plant tissue culture: applications and limitations**. Elsevier, 1990. p. 67-101.

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Can. J. Chem.**, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

PEREIRA-NETTO, A.B.; MENESTRINA, J.M.; ALQUINI, Y.; CARNEIRO LEÃO, A.M.A.; IACOMINI, M. Inhibitory effects of an arabinogalactan on the somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.) cells. In: **The American Society of Plant Physiologists**, 1999, Abstract n 706.

PEREIRA-NETTO, A.B.; CARNEIRO LEÃO, A.M.A.; ALQUINI, Y.; MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M. Changes on the differentiation pattern of carrot cells induced by a sulphated alpha-D-glucan and an arabinogalactan. In: **The American Society of Plant Physiologists**, 1998, Abstract n. 601.

PRAKASH, C. S.; VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORENTAN, P. A., (ED.) **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee University, p. 27-37. 1992.

RYAN, C.A.; FARMER, E.E. Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.**, v. 42, p. 651-674, 1991.

SATOH, S. Functions of the cell wall in the interactions of plant cells: analysis using carrot cultured cells. **Plant Cell Physiol.**, v. 39(4), p. 361-368, 1998.

SERPE, M. D.; NOTHNAGEL, E. A. Heterogeneity of arabinogalactan-proteins on the plasma membrane of Rose cells. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 1261-1271, 1996.

SIMAS, F. F.; REIS, R. A.; MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structural aspects of the polysaccharide from the gum exudate of *Syagrus romanzoffiana* (Gerivá). In: **Anais da XXX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 2001, M-05, p. 134.

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFE, D. F. Embriões somáticos e sementes sintéticas. Em: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (ED) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. ABCTP/CNPH, 1990. p. 227-249.

TOONEN, M.A.J., SCHMIDT, E.D.L., VAN-KAMMEN, A., DE-VRIES, S.C. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. **Planta**, v. 203, p. 188-195, 1997.

TRAN THANH VAN, K., MUTAFTSCHIEV, S. Signals influencing cell elongation, cell enlargement, cell division and morphogenesis. In: Nijkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 514-519, ISBN 0-7923-0874-3, 1990.

VARGAS-RECHIA, C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; HEYRAUD, A.; DRIGUEZ, H.; LIÉNART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 1013-1021, 1998.

WAKE, H.; UMETSU, H.; MATSUNAGA, T. Somatic Embryogenesis and Artificial Seed in Carrot (*Daucus carota* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II**, v.30, p. 170-182, 1995.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ANEXO 1

Testes estatísticos relacionados ao PN

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº total de embriões (1º, 2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PN	4	0,2410256	0,060256	0,3124	0,8683
Erro	47	9,0666667	0,192908		
Total	51	9,3076923			
PN	4	2035,2895	508,822	3,3275	0,0178
Erro	46	7034,1222	152,916		
Total	50	9069,4118			
PN	4	35608,26	8902,06	5,7688	0,0008
Erro	46	70984,45	1543,14		
Total	50	106592,71			
PN	4	4527,03	1131,76	0,4743	0,7544
Erro	46	109770,66	2386,32		
Total	50	114297,69			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de embriões no estágio cotiledonar (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PN	4	28,68758	7,17190	1,3494	0,2662
Erro	46	244,48889	5,31498		
Total	50	273,17647			
PN	4	421,0307	105,258	2,7428	0,0396
Erro	46	1765,3222	38,377		
Total	50	2186,3529			
PN	4	836,6402	209,160	2,7636	0,0385
Erro	46	3481,5167	75,685		
Total	50	4318,1569			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de plântulas (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PN	4	0,688562	0,172141	0,4414	0,7780
Erro	46	17,938889	0,389976		
Total	50	18,627451			
PN	4	5,336275	1,33407	0,7275	0,5777
Erro	46	84,350000	1,83370		
Total	50	89,686275			
PN	4	22,01026	5,50256	2,3932	0,0638
Erro	47	108,06667	2,29929		
Total	51	130,07692			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria fresca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PN	4	496,308	124,077	0,3350	0,8530
Erro	47	17410,000	370,426		
Total	51	17906,308			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria seca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PN	4	74,40769	18,6019	1,5964	0,1909
Erro	47	547,65000	11,6521		
Total	51	622,05769			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - comprimento total das plântulas (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PN	4	9,15839	2,28960	0,4769	0,7525
Erro	51	244,84161	4,80082		
Total	55	254,00000			

ANEXO 2

Testes estatísticos relacionados ao PHPI

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº total de embriões (1º, 2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PHPI	4	0,764103	0,191026	0,5805	0,6782
Erro	47	15,466667	0,329078		
Total	51	16,230769			
PHPI	4	847,753	211,938	1,0275	0,4030
Erro	47	9694,767	206,272		
Total	51	10542,519			
PHPI	4	1520,495	380,124	0,4054	0,8038
Erro	46	43130,250	937,614		
Total	50	44650,745			
PHPI	4	9438,04	2359,51	0,8640	0,4929
Erro	45	122895,74	2731,02		
Total	49	132333,78			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de embriões no estágio cotiledonar (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PHPI	4	8,50256	2,12564	0,5733	0,6833
Erro	47	174,26667	3,70780		
Total	51	182,76923			
PHPI	4	604,6307	151,158	3,1017	0,0242
Erro	46	2241,7222	48,733		
Total	50	2846,3529			
PHPI	4	36,9389	9,2347	0,1481	0,9629
Erro	45	2805,5611	62,3458		
Total	49	2842,5000			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de plântulas (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PHPI	4	0,3102564	0,077564	1,4485	0,2330
Erro	47	2,5166667	0,053546		
Total	51	2,8269231			
PHPI	4	4,173529	1,04338	0,8183	0,5201
Erro	46	58,650000	1,27500		
Total	50	62,823529			
PHPI	4	7,26444	1,81611	0,5697	0,6859
Erro	45	143,45556	3,18790		
Total	49	150,72000			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria fresca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PHPI	4	1478,531	369,633	0,6786	0,6103
Erro	46	25055,822	544,692		
Total	50	26534,353			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria seca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PHPI	4	38,02647	9,50662	1,7552	0,1542
Erro	46	249,15000	5,41630		
Total	50	287,17647			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - comprimento total das plântulas (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PHPI	4	33,85411	8,46353	1,6540	0,1700
Erro	73	373,53050	5,11686		
Total	77	407,38462			

ANEXO 3

Testes estatísticos relacionados ao PDSI

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº total de embriões (1º, 2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PDSI	4	0,364103	0,091026	0,3085	0,8708
Erro	47	13,866667	0,295035		
Total	51	14,230769			
PDSI	4	2395,333	598,833	3,1187	0,0235
Erro	47	9024,667	192,014		
Total	51	11420,000			
PDSI	4	24493,79	6123,45	3,2164	0,0205
Erro	47	89479,85	1903,82		
Total	51	113973,44			
PDSI	4	70180,29	17545,1	3,5722	0,0128
Erro	46	225932,89	4911,6		
Total	50	296113,18			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de embriões no estágio cotiledonar (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PDSI	4	53,46026	13,3651	2,3320	0,0695
Erro	47	269,36667	5,7312		
Total	51	322,82692			
PDSI	4	235,0103	58,7526	0,9775	0,4289
Erro	47	2825,0667	60,1078		
Total	51	3060,0769			
PDSI	4	3159,7931	789,948	6,8475	0,0002
Erro	46	5306,7167	115,363		
Total	50	8466,5098			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de plântulas (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PDSI	4	0,1064103	0,026603	0,6882	0,6037
Erro	47	108166667	0,038652		
Total	51	1,9230769			
PDSI	4	12,992308	3,24808	1,9969	0,1104
Erro	47	76,450000	1,62660		
Total	51	89,442308			
PDSI	4	9,96601	2,49150	0,7817	0,5429
Erro	46	146,62222	3,18744		
Total	50	156,58824			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria fresca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PDSI	4	1433,533	358,383	0,6744	0,6131
Erro	46	24444,389	531,400		
Total	50	25877,922			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria seca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PDSI	4	58,70621	14,6766	2,2805	0,0749
Erro	46	296,03889	6,4356		
Total	50	354,74510			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - comprimento total das plântulas (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PDSI	4	14,31423	3,57856	0,9596	0,4350
Erro	72	268,49097	3,72904		
Total	76	282,80519			

ANEXO 4

Testes estatísticos relacionados ao PNS

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº total de embriões (1º, 2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PNS	4	1,164103	0,291026	0,9078	0,4671
Erro	47	15,066667	0,320567		
Total	51	18,230769			
PNS	4	1820,1833	455,046	4,4265	0,0041
Erro	47	4831,5667	102,799		
Total	51	6651,7500			
PNS	4	6096,973	1524,24	1,2973	0,2847
Erro	47	55220,950	1174,91		
Total	51	61317,923			
PNS	4	32227,03	8056,76	5,2586	0,0014
Erro	47	72009,67	1532,12		
Total	51	104236,69			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de embriões no estágio cotiledonar (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PNS	4	48,783333	12,1958	1,8552	0,1341
Erro	47	308,96667	6,5738		
Total	51	357,75000			
PNS	4	714,8256	178,706	3,2683	0,0191
Erro	47	2569,8667	54,678		
Total	51	3284,6923			
PNS	4	1794,2641	448,566	6,7041	0,0002
Erro	47	3144,7167	66,909		
Total	51	4938,9808			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - nº de plântulas (2º, 3º e 4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PNS	4	0,2025641	0,050641	0,3768	0,8240
Erro	47	6,3166667	0,134397		
Total	51	6,5192308			
PNS	4	7,97692	1,99423	1,0095	0,4122
Erro	47	92,85000	1,97553		
Total	51	100,82692			
PNS	4	16,65641	4,16410	1,6007	0,1898
Erro	47	122,26667	2,60142		
Total	51	138,92308			

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria fresca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PNS	4	1306,300	326,575	0,6414	0,6358
Erro	45	22912,200	509,160		
Total	49	24218,500			

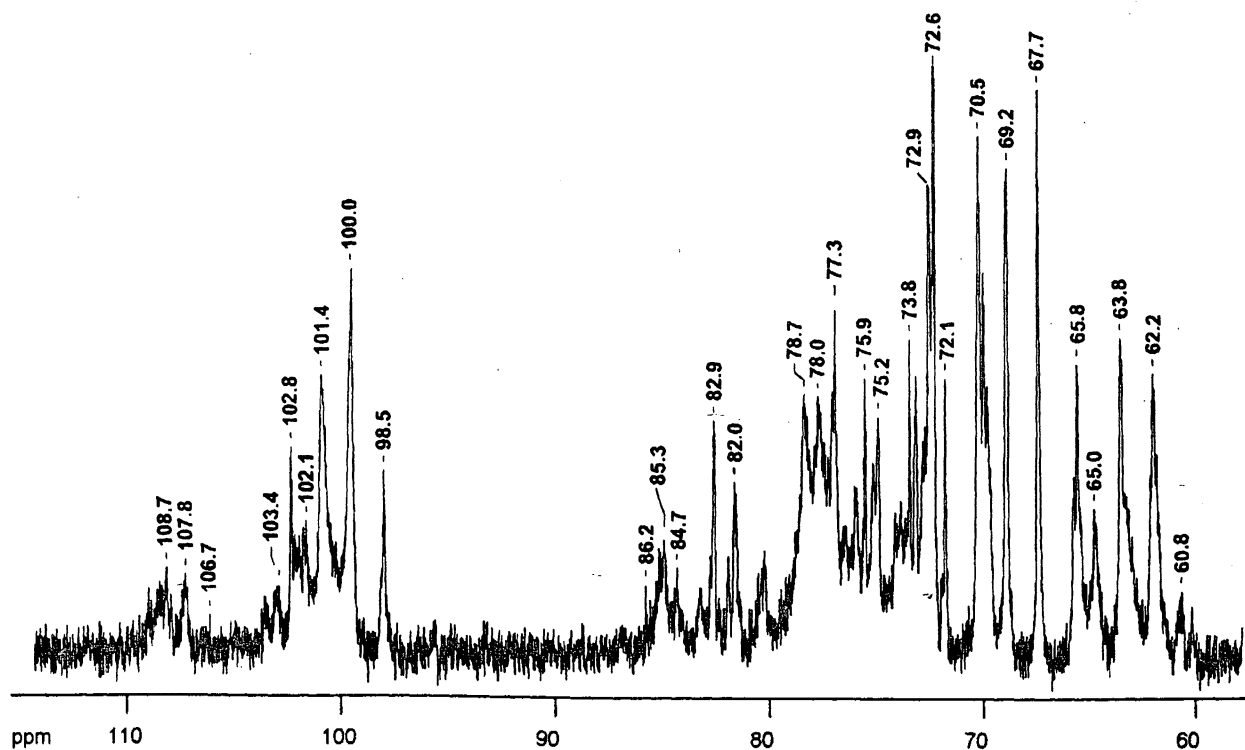
ANÁLISE DE VARIÂNCIA - matéria seca (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PNS	4	64,37000	16,0925	1,9702	0,1153
Erro	45	367,55000	8,1678		
Total	49	431,92000			

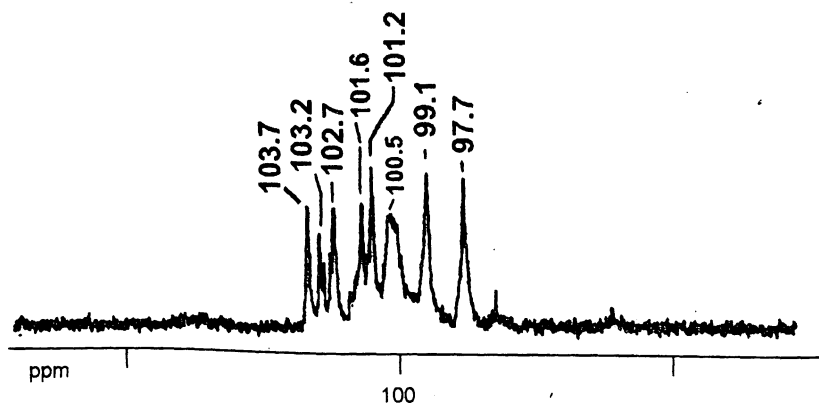
ANÁLISE DE VARIÂNCIA - comprimento total das plântulas (4º semana)

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	prob.
PNS	4	27,90054	6,97514	1,9698	0,1096
Erro	65	230,17089	3,54109		
Total	69	258,07143			

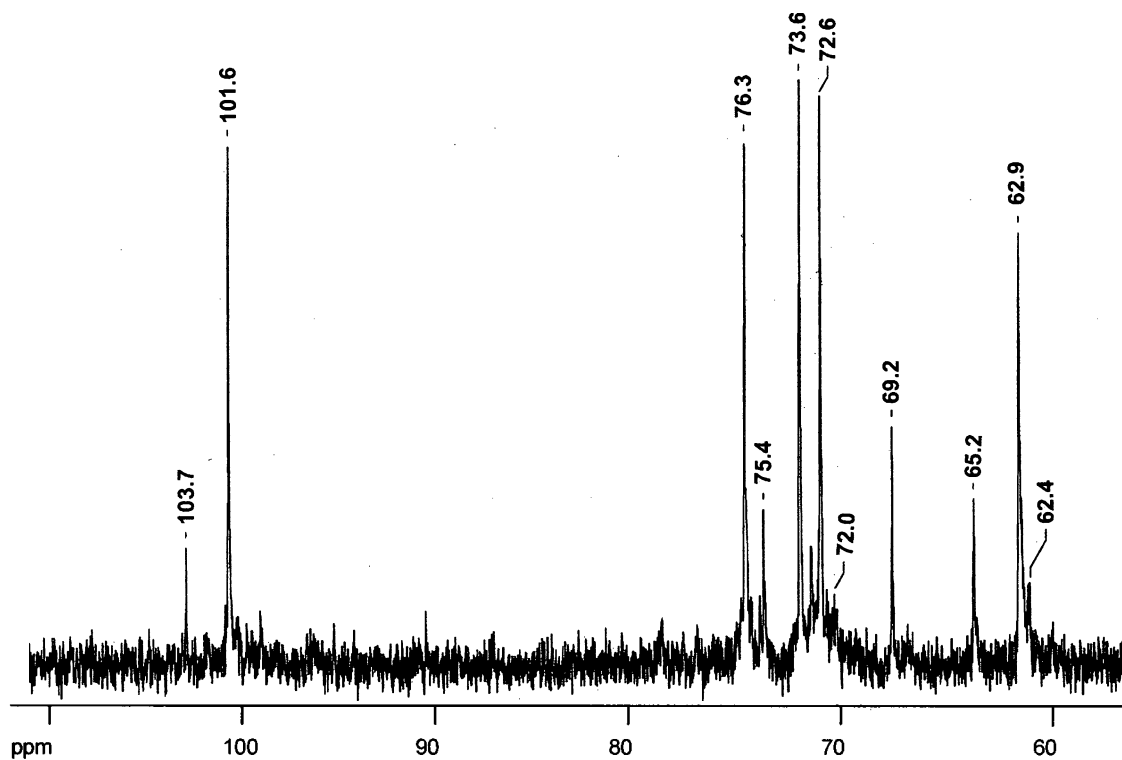
ANEXO 5

ESPECTROS DE RMN- C^{13} DO PN, PHPI E PDSI

Espectro de RMN- C^{13} (110 até 60 ppm) do polissacarídeo nativo (PN) (100,61 MHz, D_2O , 323 K).



Espectro de RMN- C^{13} (região de C-1) do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (PHPI) (100,61 MHz, D_2O , 323 K).



Espectro de RMN- ^{13}C (110 até 60 ppm) do polissacarídeo degradado (PDSI) (100,61 MHz, NaOD- D_2O , 323 K).