

Efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o metabolismo extracelular de *Rudgea jasminoides* durante o crescimento

Clóvis José Fernandes de Oliveira Junior¹, Márcia Regina Braga¹ e Marcos Silveira Buckeridge^{2,3}

Recebido: 25.10.2005; aceito: 24.03.2006

ABSTRACT - (Effects of xyloglucan oligosaccharides on the extracellular metabolism of *Rudgea jasminoides* during growth). Xyloglucan (XG), a hemicellulose from the plant cell wall responsible for the spacing and alignment of cellulose microfibrils, also acts as a signal molecule for cell growth. In this work fucosylated (XXFG) and galactosylated oligosaccharides (XLLG, XLXG and XXLG) of XG from copaiba seeds and bean cell suspension cultures were added to cell suspensions of *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) and the effects on growth and enzymatic activities related to cell wall metabolism were evaluated. XLLG promoted an increase in the secretion of protons to extracellular medium, since its pH decreased, whereas XXFG seemed to inhibit this process. Both oligosaccharides, as well as XXXG, induced an increase in the activities of the exo-hydrolases β -galactosidase and β -glucosidase, both related to wall metabolism. These results indicate that in spite of the fact that XG represents only 2% of cell wall dry mass of *R. jasminoides* it plays a role in the control of cell extension.

Key words: cell growth, cell wall, hemicellulose, oligosaccharins

RESUMO - (Efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o metabolismo extracelular de *Rudgea jasminoides* durante o crescimento). O xiloglucano (XG), uma hemicelulose da parede celular vegetal responsável pelo espaçamento e ordenação das microfibrilas de celulose, parece atuar como um sinalizador do crescimento celular. Neste trabalho, oligossacarídeos de xiloglucano (OXGs) fucosilados (XXFG) e galactosilados (XLLG, XLXG e XXLG) obtidos de sementes de copaíba (XLLG) e de suspensões celulares de feijão (XXFG e XXXG) foram adicionados a suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) para análises de seus efeitos sobre o crescimento e atividades de enzimas do metabolismo da parede celular. O XLLG promoveu aumento da secreção de prótons para o meio extracelular, ocasionando um abaixamento do pH, enquanto que XXFG inibiu este processo. Ambos OXGs e também o XXXG induziram aumento nas atividades de β -galactosidase e β -glucosidase, exo-hidrolases relacionadas ao crescimento celular. Esses resultados indicam que apesar do XG compor apenas 2% do peso seco da parede celular de *R. jasminoides*, ele tem papel no controle da expansão celular.

Palavras-chave: crescimento celular, hemiceluloses, oligossacarinas, parede celular

Introdução

A parede celular dos vegetais superiores é composta por três domínios que, interagindo entre si, exercem várias funções, como manter a forma celular, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, funcionar como proteção ao ataque de microorganismos, armazenar reservas e atuar como fonte de moléculas sinalizadoras em processos bioquímicos e fisiológicos (Carpita & Gibeaut 1993). O primeiro dos domínios é formado por microfibrilas de celulose entrelaçadas por hemiceluloses, o que basicamente confere resistência mecânica à célula

vegetal. O segundo, composto por substâncias pécicas, atua como controlador da porosidade da parede celular e o terceiro é formado por material protéico que pode ter tanto papel estrutural como metabólico (enzimas) (Carpita & Gibeaut 1993).

As hemiceluloses agrupam vários polissacarídeos da parede, sendo o xiloglucano (XG) um de seus principais componentes em muitas espécies vegetais. A cadeia principal do XG é idêntica à da celulose, ou seja, uma cadeia linear de glucoses ligadas β -1,4, na qual se unem, na forma de ramificações laterais, unidades de xilose, xilose-galactose ou xilose-galactose-fucose (McCann & Roberts 1991,

1. Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061- 970 São Paulo, SP, Brasil

2. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Caixa Postal 11461, 05422-970 São Paulo, SP, Brasil

3. Autor para correspondência: msbuck@usp.br

Buckeridge *et al.* 1992, 1997). O xiloglucano liga-se às microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio, mantendo o espaçamento entre as mesmas e impedindo que estas se juntem e formem feixes muito espessos (McCann *et al.* 1990). A remoção do xiloglucano causa um colapso nas microfibrilas de celulose, fazendo com que estas percam o espaçamento e a orientação (Hayashi 1989).

Quando a célula cresce, as ligações existentes entre os polissacarídeos de parede são quebradas e rearranjadas para permitir o alongamento e a expansão celular e, simultaneamente, novos polissacarídeos são sintetizados e inseridos nos locais de quebra (Albersheim *et al.* 1996).

O XG na parede primária é um dos mais prováveis sítios de alteração da rede de microfibrilas (Hayashi 1989). Enzimas como a xiloglucano transglicosilase hidrolase (XTH) atuam na degradação, no rearranjo e na reconstrução deste polissacarídeo da parede celular, permitindo, deste modo, o alongamento, a expansão e o crescimento celular (Nishitani 1997, Rose *et al.* 2002).

Em paredes primárias de dicotiledôneas, o xiloglucano é composto por glucose e xilose, podendo apresentar, em maior ou menor grau, galactose ou galactose e fucose (Hayashi 1989, Baba *et al.* 1994). O xiloglucano de monocotiledôneas geralmente não contém unidades terminais de fucose, possui menos xilose e muito menos galactose que os de dicotiledôneas, embora existam exceções, como a cebola (*Allium cepa*), onde o polissacarídeo é semelhante ao encontrado em dicotiledôneas (Hayashi 1989).

Hayashi *et al.* (1994) observaram que XGs fucosilados, derivados de parede celular de ervilha, apresentam maior adsorção à celulose quando comparados aos não fucosilados, como aquele extraído de *Tamarindus indica*. Augur *et al.* (1992) sugeriram também que as unidades fucosil seriam necessárias para a manutenção da rede celulose-xiloglucano. Lima & Buckeridge (2001) confirmaram e estenderam esses resultados, demonstrando que o XG de feijão, que é altamente fucosilado, interage mais extensivamente com celulose do que aquele extraído de sementes de jatobá, que apresenta grau de fucosilação muito menor do que os XGs de parede primária (Buckeridge *et al.* 1997). Mais recentemente, evidências foram produzidas demonstrando que a presença da fucose parece não ser essencial para a manutenção das propriedades mecânicas da parede

celular em *Arabidopsis* (Vanzin *et al.* 2002). Lima *et al.* (2004) demonstraram que a presença ou não da fucose só tem efeito na velocidade de ligação do XG à celulose, mas o fator determinante da ligação não é a presença da fucose, e sim o tamanho da molécula de xiloglucano. Apesar da fucose ter influência comprovada na conformação e propriedades físico-químicas do xiloglucano (Lima *et al.* 2004), talvez o principal papel do XG fucosilado seja na regulação do processo de expansão celular.

Quando hidrolisado com endoglucanases, o XG é reduzido a blocos (oligossacarídeos) contendo quatro unidades de glucose e três de xilose, os quais podem ou não estar ramificados com unidades de galactose e fucose (Hayashi 1989). Fry *et al.* (1993a) propuseram uma nomenclatura não ambígua para os oligossacarídeos de XG, na qual cada glucose da cadeia principal seria denominada por uma letra de acordo com o último monossacarídeo a ela ligado, ou seja, se não houver nenhuma unidade ligada, esta glucose recebe a letra G, se à glucose estiver ligado uma unidade xilosil, esta recebe a letra X, se na xilose houver uma galactose, esta recebe uma letra L e, caso exista uma unidade fucosil ligada à galactose, esta recebe uma letra F (XXXG, heptassacarídeo contendo 4 glucoses e 3 xiloses; XLLG, nonassacarídeo com 4 glucoses, 3 xiloses e 2 galactoses; XXFG, nonassacarídeo com 4 glucoses, 3 xiloses, 1 galactose e 1 fucose).

Nos últimos vinte anos, vários estudos têm demonstrado que oligossacarídeos da parede celular podem, em baixas concentrações, exercer efeitos biológicos sobre tecidos vegetais, sendo denominados genericamente de oligossacarinas (Albersheim *et al.* 1996). Oligossacarídeos específicos, do tipo XXFG, produzidos a partir do xiloglucano de parede celular por digestão com celulase, podem antagonizar o efeito produzido pela auxina (York *et al.* 1984, Fry *et al.* 1993b). McDougall & Fry (1990), analisando o efeito de uma mistura de oligossacarídeos não fucosilados de XG (XXXG, XLG e XLLG) no crescimento de segmentos de caule de ervilha, observaram efeito inverso, com um significativo aumento no alongamento, especialmente em concentrações ao redor de 10^{-6} M.

Com base nesses resultados, foi sugerido que oligossacarídeos de XG contendo fucose em sua estrutura inibem o alongamento de segmentos de caule de ervilha, enquanto aqueles sem a unidade fucosil causam um aumento significativo no alongamento dos mesmos, demonstrando a importância deste açúcar

no controle do crescimento (Lorences *et al.* 1990). Esta pequena alteração de estrutura, modulando os efeitos dos oligossacarídeos de xiloglucano, sugere a existência de um controle da expansão celular finamente ajustado (Aldington *et al.* 1991).

Oliveira Júnior (2004) verificou que o XG compõe apenas cerca de 2% dos polissacarídeos da parede celular de suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae), sendo os arabinoxilanos as hemiceluloses predominantes. A manutenção de XG nesta espécie vegetal, assim como nas monocotiledôneas que também possuem arabinoxilanos como polímeros preponderantes, poderia estar relacionada à ação desta molécula no processo de sinalização para expansão celular. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos de diferentes tipos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o crescimento de suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* e sobre a atividade de β -galactosidase e β -glucosidase, enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos da parede celular.

Material e métodos

Material vegetal e condições de cultura - Calos e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae) foram estabelecidos de acordo com Stella & Braga (2002). Os calos foram mantidos em meio RM-65 [meio MS modificado, contendo tiamina-HCl ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$), tiamina (10 mg L^{-1}), cisteína (1 mg L^{-1}), ácido nicotínico (1 mg L^{-1}), piridoxina (1 mg L^{-1})], suplementado com água de coco (50 mL L^{-1}), sacarose (3%), Picloram (2 mg L^{-1}), solidificado com 0,6% de ágar e autoclavado ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos). A suspensão celular foi estabelecida pela transferência de calos friáveis para o meio RM-65 líquido, sendo os frascos mantidos em agitador orbital (100 ciclos por minuto) com fotoperíodo de 12 horas, a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Obtenção dos oligossacarídeos de xiloglucano - Xiloglucano galactosilado (XLLG) foi extraído a partir do pó seco de sementes quiescentes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) utilizando água destilada a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação contínua, durante 6 horas. Após a extração, o material foi filtrado em náilon pele de ovo e, a este, foram adicionados 3 volumes de etanol para precipitação do XG ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 horas). Após nova filtração, o XG foi lavado com etanol e acetona e, em seguida, seco em estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. O material seco foi novamente solubilizado em água destilada,

centrifugado (para retirada de impurezas) e liofilizado. Os XGs fucosilados (XXFG) e também do tipo XXXG foram extraídos a partir da parede de células de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. carioquinha) cultivadas em suspensão (Karr & Albersheim 1970) e fracionadas conforme descrito por Gorshokova *et al.* (1996).

Os XGs de copaíba e feijão foram hidrolisados com endoglucanase (celulase Megazyme®) para obtenção dos oligossacarídeos de xiloglucano (OXGs) conforme descrito por Buckeridge *et al.* (1992) e purificados por cromatografia dupla em gel de exclusão molecular (coluna cromatográfica Bio-Gel P4), associada a análises das frações coletadas em cromatografia líquida de alta resolução, para obtenção dos tipos XLLG, XXFG e XXXG (Tiné 2002, Oliveira Júnior 2004). XLLG e XXXG apresentaram grau de pureza de 90%, sendo os 10% contaminantes representados por XLXG e XXLG. Para XXFG foi obtida purificação de 80% (Oliveira Júnior 2004).

Condições dos ensaios com oligossacarídeos de xiloglucano - Alíquotas de 2 mL de suspensão celular no final da fase exponencial de crescimento, contendo aproximadamente 0,2 g de massa fresca de células foram transferidas para 12 mL de meio novo, em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Os oligossacarídeos de xiloglucano (OXGs) foram adicionados aos meios após filtração em filtros Millipore $0,20 \text{ }\mu\text{m}$, sendo aplicados no início da fase exponencial de crescimento (6 dias). Para as análises, foram efetuadas duas coletas, ainda dentro da fase exponencial de crescimento celular (com 8-9 e 14-15 dias). Em cada coleta, foram retirados seis frascos por tratamento, para as análises de crescimento (medidas do volume celular empacotado e da massa seca), do pH extracelular, das atividades das enzimas β -galactosidase e β -glucosidase e dos teores de açúcares totais presentes no meio de cultura. Para obtenção das medidas do volume celular empacotado e das massas fresca e seca, as culturas foram centrifugadas (433 g por 2 min) em tubos cônicos graduados, anotando-se o volume celular empacotado. O resíduo (células) foi utilizado para obtenção das massas fresca e seca e o sobrenadante (meio extracelular – MEC) para as demais análises. Foram realizados três ensaios com os oligossacarídeos de xiloglucano purificados, dos tipos XLLG, XXFG e XXXG, em concentrações de 10^{-6} a 10^{-8} M .

Análise dos açúcares extracelulares - Os açúcares

totais foram quantificados nos meios extracelulares pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) sendo utilizada glucose como padrão.

Medida das atividades enzimáticas - As atividades das enzimas β -galactosidase e β -glucosidase foram medidas segundo Tiné *et al.* (2000), com algumas modificações. As incubações continham 10 μ L de tampão acetato de amônio 1 M, pH 5,0, 50 μ L dos meios extracelulares (MECs), 50 μ L de água deionizada e 20 μ L dos substratos sintéticos específicos *p*-nitrofenil- β -galactopiranosídeo ou *p*-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (Sigma) ambos em concentração de 50 mM, para β -galactosidase ou β -glucosidase, respectivamente. As misturas foram incubadas a 40 °C durante 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 250 μ L de Na₂CO₃ 0,1 N. A leitura foi efetuada a 405 nm em espectrofotômetro e a atividade enzimática calculada através da divisão da absorbância pelo coeficiente de extinção molar do substrato sintético (*p*-nitrofenol, 18400).

Análise estatística - O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições (frascos) por tratamento, para cada coleta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados

Conforme relatado por Stella & Braga (2002), suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* apresentam crescimento exponencial de 6 a 18 dias de cultivo. Oligossacarídeos de xiloglucano foram

aplicados aos 6 dias de idade da cultura e as coletas para avaliar os efeitos de diferentes oligossacarídeos foram efetuadas logo após o início do crescimento exponencial (entre 8 e 9 dias de idade) e quando a taxa de crescimento foi máxima (entre 14 e 15 dias de idade).

Os efeitos da aplicação de oligossacarídeos de xiloglucano tipo XXXG (não galactosilados e não fucosilados) nas suspensões celulares de *R. jasminoides* só foram observados na segunda coleta (após 14-15 dias), havendo aumento significativo do pH extracelular e das atividades de β -galactosidase e β -glucosidase, quando foram utilizadas concentrações de 10⁻⁷ e 10⁻⁸ M (tabela 1). Nestes tratamentos, não houve alteração dos parâmetros de crescimento nas duas medidas efetuadas, com exceção do aumento do volume celular empacotado ocasionado pela aplicação de XXXG a 10⁻⁸ M.

A adição de oligossacarídeos galactosilados de xiloglucano do tipo XLLG a 10⁻⁸ M levou à diminuição significativa nos valores de pH extracelular aos 9 dias de cultivo (tabela 2). Aos 15 dias, foi observado efeito inverso. Para todas as concentrações utilizadas, foi verificado aumento nas atividades de β -galactosidase e β -glucosidase do meio extracelular (tabela 2). Nota-se que a aplicação de XLLG provocou aumento de cerca de duas vezes na atividade de β -galactosidase. Para a β -glucosidase esse aumento foi ainda maior (tabela 2). Além disso, aos 9 dias de cultivo foi observada tendência de redução do volume celular empacotado nas concentrações de 10⁻⁷ e 10⁻⁸ M, porém sem diferenças estatisticamente significativas, quando compa-

Tabela 1. Efeitos biológicos da aplicação de oligossacarídeos de xiloglucano do tipo XXXG em suspensões celulares de *R. jasminoides*.

Tratamento [XXXG]	Volume celular empacotado (μ l mL ⁻¹)	Massa seca (mg mL ⁻¹ de cultura)	pH extracelular	β -galactosidase (mol Gal mL ⁻¹ h ⁻¹)	β -glucosidase (mol Glc mL ⁻¹ h ⁻¹)
1 ^a Coleta (8-9 d)					
Controle	128 a	3,64 a	3,84 a	6,82 × 10 ⁻⁶ ab	1,28 × 10 ⁻⁵ a
10 ⁻⁶ M	132 a	3,81 a	3,86 a	7,26 × 10 ⁻⁶ ab	1,40 × 10 ⁻⁵ a
10 ⁻⁷ M	135 ab	3,90 a	4,00 a	9,40 × 10 ⁻⁶ b	1,43 × 10 ⁻⁵ a
10 ⁻⁸ M	146 b	4,03 a	3,73 a	6,33 × 10 ⁻⁶ a	1,19 × 10 ⁻⁵ a
2 ^a Coleta (14-15 d)					
Controle	207 a	6,21 a	3,68 a	4,74 × 10 ⁻⁶ a	1,24 × 10 ⁻⁵ a
10 ⁻⁶ M	208 a	6,05 a	3,70 a	3,37 × 10 ⁻⁶ a	1,59 × 10 ⁻⁵ b
10 ⁻⁷ M	221 a	5,35 a	3,86 b	9,45 × 10 ⁻⁶ b	2,77 × 10 ⁻⁵ c
10 ⁻⁸ M	211 a	5,51 a	3,87 b	7,85 × 10 ⁻⁶ b	2,68 × 10 ⁻⁵ c

Médias (n = 6) seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras comparam dados na mesma coleta.

Tabela 2. Efeitos biológicos da aplicação de oligossacarídeos de xiloglucano do tipo XLLG em suspensões celulares de *R. jasminoides*.

Tratamento [XLLG]	Volume celular empacotado ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	Massa seca (mg mL^{-1} de cultura)	pH extracelular	β -galactosidase ($\text{mol Gal mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	β -glucosidase ($\text{mol Glc mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
1ª Coleta (8-9 d)					
Controle	166,67 ab	4,83 a	3,83 a	$1,21 \times 10^{-6}$ a	$1,84 \times 10^{-6}$ a
10^{-6} M	167,86 b	4,90 a	3,83 a	$1,85 \times 10^{-6}$ b	$5,15 \times 10^{-6}$ c
10^{-7} M	157,14 a	4,88 a	3,70 ab	$2,17 \times 10^{-6}$ b	$4,99 \times 10^{-6}$ c
10^{-8} M	159,52 ab	4,85 a	3,65 b	$2,28 \times 10^{-6}$ b	$3,44 \times 10^{-6}$ b
2ª Coleta (14-15 d)					
Controle	330,95 a	9,88 ab	4,21 a	$1,05 \times 10^{-5}$ a	$7,59 \times 10^{-5}$ a
10^{-6} M	340,48 a	9,52 a	4,35 ab	$1,34 \times 10^{-5}$ b	$8,90 \times 10^{-5}$ a
10^{-7} M	328,57 a	10,31 ab	4,45 b	$1,26 \times 10^{-5}$ ab	$8,84 \times 10^{-5}$ a
10^{-8} M	354,76 a	10,79 b	4,48 b	$1,18 \times 10^{-5}$ ab	$7,86 \times 10^{-5}$ a

Médias (n = 6) seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras comparam dados na mesma coleta.

radas ao controle. Efeitos sobre o crescimento foram notados aos 15 dias, quando houve uma tendência ao aumento de matéria seca na concentração de 10^{-8} M (tabela 2). Esse aumento pode ser correlacionado com o maior consumo de açúcares totais do meio de cultura observado nas células tratadas com o XLLG (tabela 3). Alterações no consumo de açúcares não foram significativas quando da adição de XXXG ou XXFG (dados não mostrados).

Em contraste ao ensaio anterior, no qual pode ser observado que a aplicação dos oligossacarídeos do tipo XLLG levou a uma acidificação do meio extracelular aos 9 dias (tabela 2), a aplicação dos oligossacarídeos do tipo XXFG determinou aumento significativo nos valores de pH nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-8} M, aos 9 e 15 dias (tabela 4). A adição XXFG não ocasionou alterações significativas nos parâmetros de crescimento analisados, quando comparados ao controle. As alterações nas atividades enzimáticas apresentaram diferença significativa

apenas para β -glucosidase na concentração de 10^{-8} M, aos 15 dias (tabela 4).

Discussão

Diversos estudos têm demonstrado que oligossacarídeos de xiloglucano podem exercer efeitos biológicos sobre tecidos vegetais (York *et al.* 1984, Fry *et al.* 1993b), sendo que alguns deles apontam para efeitos de OXGs galactosilados similares àqueles promovidos por auxinas (McDougall & Fry 1988, 1990, Emmerling & Seitz 1990, Lorences *et al.* 1990, Augur *et al.* 1992, Vargas-Rechia *et al.* 1998).

A análise geral dos ensaios mostrados neste trabalho revela que, apesar dos oligossacarídeos de xiloglucano terem induzido poucas alterações significativas nos parâmetros de crescimento celular analisados, sua presença no meio de cultura de suspensões celulares de *R. jasminoides* durante a fase de crescimento exponencial levou a alterações no pH e na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos da parede e à expansão celular (tabelas 1, 2, 4). Essas alterações foram variáveis de acordo com o oligossacarídeo utilizado, o que sugere que OXGs apresentam atividade biológica como moléculas sinalizadoras. As pequenas variações observadas nos parâmetros de crescimento por ação dos diferentes OXGs devem-se provavelmente ao fato dessas avaliações não serem refinadas o suficiente para indicar alterações, por exemplo, na extensão celular. Entretanto, medidas indiretas como o aumento no consumo de açúcar do meio (tabela 3) e o incremento na atividade de enzimas extracelulares relacionadas à

Tabela 3. Teores de açúcares totais no meio extracelular de suspensões de *Rudgea jasminoides* cultivada em suspensão e tratadas com XLLG, após 15 dias de cultivo.

Tratamento	Açúcar total (mg mL^{-1})
Controle	11,68 b
10^{-6} M	9,01 a
10^{-7} M	9,90 ab
10^{-8} M	8,30 a

Médias (n = 6) seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4. Efeitos biológicos da aplicação de oligossacarídeos de xiloglucano do tipo XXFG em suspensões celulares de *R. jasminoides*.

Tratamento [XXFG]	Volume celular empacotado ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	Massa seca (mg mL^{-1} de cultura)	pH extracelular	β -galactosidase ($\text{mol Gal mL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	β -glucosidase ($\text{mol Glc mL}^{-1} \text{h}^{-1}$)
1ª Coleta (8-9 d)					
Controle	153 a	4,03 a	3,67 a	$8,41 \times 10^{-7}$ a	$4,01 \times 10^{-6}$ a
10^{-6} M	153 a	4,40 a	3,60 a	$7,91 \times 10^{-7}$ a	$4,13 \times 10^{-6}$ a
10^{-7} M	140 a	4,04 a	3,87 b	$9,09 \times 10^{-7}$ a	$6,30 \times 10^{-6}$ a
10^{-8} M	151 a	4,27 a	3,90 b	$1,03 \times 10^{-6}$ a	$5,47 \times 10^{-6}$ a
2ª Coleta (14-15 d)					
Controle	268 a	6,14 ab	3,62 a	$1,40 \times 10^{-6}$ a	$4,38 \times 10^{-5}$ a
10^{-6} M	274 a	7,64 b	3,63 a	$1,80 \times 10^{-6}$ a	$4,67 \times 10^{-5}$ a
10^{-7} M	258 a	4,94 a	3,73 b	$1,79 \times 10^{-6}$ a	$6,71 \times 10^{-5}$ a

Medidas (n = 6) seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

extensão da parede celular (p. ex. tabela 2) indicam intensificação do metabolismo celular, ocasionada pela adição de oligossacarídeos de xiloglucano.

Além disto, os efeitos observados nos valores de pH extracelular, principalmente nos ensaios com XLLG e XXFG são coerentes com aqueles descritos para outros sistemas biológicos (Fry 1989, Hayashi 1989, McDougall & Fry 1991a, b). A redução do pH ocasionada pela adição de XLLG às suspensões celulares de *R. jasminoides* (tabela 2) pode estar relacionada à ativação de ATPases de membrana, que através do bombeamento de prótons para o meio apoplástico, ocasiona sua acidificação, como ocorre por efeito de auxinas (Rayle & Cleland 1970, 1992). Variações no pH extracelular (diminuição seguida de aumento) ocorrem normalmente durante o crescimento de células cultivadas em suspensão e têm sido atribuídas à absorção inicial de amônia e posteriormente de nitrato (Leifert *et al.* 1992, Moser *et al.* 2004). Em *R. jasminoides*, oscilações similares foram observadas nas culturas por efeito da adição de XLLG (tabela 2), mas não de XXXG e XXFG (tabelas 1, 3). Tais observações são compatíveis com os efeitos observados sobre as células somente quando da adição de XLLG e sugerem interferência de OXGs no metabolismo celular dessas suspensões.

Os efeitos observados pela adição de XXFG às culturas de *R. jasminoides* (tabela 4) também são coerentes com os relatos feitos por McDougall & Fry (1988), que observaram inibição do alongamento induzido por auxinas em segmentos de caule de ervilha.

Augur *et al.* (1992) verificaram, também em caules de ervilha, que a unidade fucosil no oligossacarídeo de xiloglucano é essencial para inibir o crescimento estimulado por auxinas. Esses autores observaram que o XFFG foi mais eficaz que o XXFG na inibição do crescimento estimulado por auxinas.

Hoson *et al.* (1991) relataram a importância da estrutura do xiloglucano para seu efeito biológico. Através do uso de lectinas que se ligam na unidade fucosil do xiloglucano, foi bloqueada a inibição promovida pelo XXFG sobre o crescimento induzido por auxinas, em epicótilos de feijão azuki. Dunand *et al.* (2000) apresentaram evidências da existência de receptores, cuja presença já havia sido sugerida por Lorences *et al.* (1990), os quais reconhecem a cadeia lateral do XG composta por xilose-galactose-fucose, necessária para atividade anti-auxínica promovida pelo oligossacarídeo de xiloglucano.

Deste modo, é possível sugerir que os oligossacarídeos de XG exerçam, de alguma forma, sinalização sobre os eventos bioquímicos que ocorrem na parede celular durante o desenvolvimento vegetal. Esta sinalização parece estar relacionada principalmente à atividade de ATPases de membrana plasmática que atuam no bombeamento de prótons para o espaço extracelular. Isto parece ser um ponto chave para regulação dos mecanismos de expansão celular, já que a atividade das enzimas que agem no afrouxamento da parede celular é regulada pelo pH apoplástico, e como observado nestes ensaios, os oligossacarídeos de xiloglucano do tipo XLLG aumentaram a secreção de prótons para o meio

extracelular, enquanto que os oligossacarídeos do tipo XXFG a diminuiram.

Os dados obtidos neste trabalho, juntamente com diversos relatos anteriores, apontam para a importância da estrutura e composição dos oligossacarídeos de xiloglucano na sinalização do desenvolvimento celular. Pauly *et al.* (2001) apresentaram evidências de participação do XG como molécula chave para desenvolvimento da parede celular primária. Estes autores observaram em segmentos de caule de ervilha estiolados ou crescidos sob luz que a razão entre XXG/XXXG aumenta com o amadurecimento do caule e este perde a capacidade de se alongar.

É importante salientar que até o momento ainda não foram descritas espécies de plantas superiores desprovidas de xiloglucano, sendo esta ocorrência possivelmente universal nestes grupos vegetais (Albersheim *et al.* 1996). É possível, portanto, que o xiloglucano tenha sido preservado durante a evolução devido ao seu papel na sinalização de eventos metabólicos, em oposição à sua conhecida função estrutural nas paredes celulares encontradas em dicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinóides (Carpita & Gibeaut 1993). Deste modo, não se pode descartar a possibilidade de que, mesmo nas paredes celulares nas quais predominam arabinoxilanos como polímeros associados à celulose, como é o caso de *R. jasmínoides* (Oliveira Júnior 2004), os xiloglucanos estejam presentes devido ao seu papel como sinalizadores de eventos relacionados ao crescimento celular. De fato, os resultados mostrados neste trabalho parecem corroborar esta hipótese, pois os oligossacarídeos de xiloglucano, mesmo presentes em pequenas quantidades em paredes celulares de *R. jasmínoides*, podem sinalizar processos metabólicos relacionados à extensão celular, como o abaixamento do pH apoplástico e a conseqüente ativação de enzimas envolvidas no metabolismo de polímeros da parede celular.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pela bolsa de doutorado concedida a C.J.F. Oliveira Júnior (processo 99/04109-8) e pelo auxílio ao projeto temático FAPESP (processo 98/05124-8) dentro do programa BIOTASP. M.R. Braga e M.S. Buckeridge agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa.

Literatura citada

- Albersheim, P., Darvill, A.G., O'Neill, M.A., Schols, H.A. & Voragen, A.G.J. 1996. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *In*: J. Visser & A.G.J. Voragen (eds.). Pectins and Pectinases. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 47-55.
- Aldington, S., McDougall, G.J. & Fry, S.C. 1991. Structure-activity relationships of biologically active oligosaccharides. *Plant Cell & Environment* 14: 625-636.
- Augur, C., Yu, L., Sakai, K., Ogawa, T., Sinaý, P., Darvill, A.G. & Albersheim, P. 1992. Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. *Plant Physiology* 99: 180-185.
- Baba, K., Sone, Y., Misaki, A. & Hayashi, T. 1994. Localization of xyloglucan in the macromolecular complex composed of xyloglucan and cellulose in pea stems. *Plant Cell Physiology* 35: 439-444.
- Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G. & Dietrich, S.M.C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum* 86: 145-151.
- Buckeridge, M.S., Crombie, H.J., Mendes, C.J.M., Reid, J.S.G., Gidley, M.J. & Vieira, C.C.J. 1997. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. *Carbohydrate Research* 303: 233-237.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *Plant Journal* 3: 1-30.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 3: 350-356.
- Dunand, C., Gautier, C., Chambat, G. & Lienart, Y. 2000. Characterization of the binding of alpha-L-fuc (1→2)-beta-D-gal (1→), a xyloglucan signal in blackberry protoplasts. *Plant Science* 151: 183-192.
- Emmerling, M. & Seitz, H.U. 1990. Influence of a specific xyloglucan-nonasaccharide derived from cell walls of suspension-cultured cells of *Daucus carota* L. on regenerating carrot protoplasts. *Planta* 182: 174-180.
- Fry, S.C. 1989. The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* 40: 1-11.
- Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.-P., Kato, Y., Lorences, E.P., Maclachlan, G.A., McNeil, M., Mort, A.J., Reid, J.S., Seitz, H.U., Selvendran, R.R., Voragen, A.G.J. & White, A.R. 1993a. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* 89: 1-3.
- Fry, S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R. & Aitken, J. 1993b. Oligosaccharide as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiology* 103: 1-5.

- Gorshokova, T.A., Wyatt, S.E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V.V. & Carpita, N.C. 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110: 721-729.
- Hayashi, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 139-168.
- Hayashi, T., Ogawa, K. & Mitsuishi, Y. 1994. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. *Plant Cell Physiology* 35: 1199-1205.
- Hoson, T., Masuda, Y., Sone, Y. & Misaki, A. 1991. Xyloglucan antibodies inhibit auxin induced elongation and cell wall loosening of azuki bean epicotyls but not of oat coleoptils. *Plant Physiology* 96: 551-557.
- Karr, A.L. & Albersheim, P. 1970. Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by "wall modifying-enzyme". *Plant Physiology* 46: 69-80.
- Leifert, C., Pryce, S., Lumsden, P.J. & Waites, W.M. 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30: 171-179.
- Lima, D.U. & Buckeridge, M.S. 2001. Interaction between cellulose and storage xyloglucan: the influence of the degree of galactosylation. *Carbohydrate Polymers* 46: 157-163.
- Lima, D.U., Loh, W. & Buckeridge, M.S. 2004. Xyloglucan-cellulose interactions depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 389-394.
- Lorences, E.P., McDougall, G.J. & Fry, S.C. 1990. Xyloglucan and cello-oligosaccharides: antagonist of the growth promoting effect of H⁺. *Physiologia Plantarum* 80: 109-113.
- McCann, M.C. & Roberts, K. 1991. Architecture of the primary cell wall. In: C.W. Lloyd (ed.). *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Academic Press, London, pp. 109-129.
- McCann, M.C., Wells, B. & Roberts, K. 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* 96: 323-334.
- McDougall, G.J. & Fry, S.C. 1988. Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. *Planta* 175: 412-416.
- McDougall, G.J. & Fry, S.C. 1990. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiology* 93: 1042-1048.
- McDougall, G.J. & Fry, S.C. 1991a. Purification and analysis of growth-regulating xyloglucan-derived oligosaccharides by high-pressure liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 219: 123-132.
- McDougall, G.J. & Fry, S.C. 1991b. Xyloglucan nonasaccharide, a naturally occurring oligosaccharin, arises in vitro by polysaccharide breakdown. *Journal of Plant Physiology* 137: 332-336.
- Moser, J.R., Garcia, M.G. & Viana, A.M. 2004. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 37-42.
- Nishitani, K. 1997. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *International Journal of Cytology* 173: 157-206.
- Oliveira Júnior, C.J.F. 2004. Carboidratos de parede celular e feitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o crescimento celular de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. cultivada em suspensão. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pauly, M., Qin, Q., Greene, H., Albersheim, P., Darvill, A. & York, W.S. 2001. Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta* 212: 842-850.
- Rayle, D.L. & Cleland, R. 1970. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology* 46: 250-253.
- Rayle, D.L. & Cleland, R.E. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.
- Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C. & Nishitani, K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiology* 43: 1421-1435.
- Stella, A. & Braga, M.R. 2002. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 271-276.
- Tiné, M.A.S. 2002. O conteúdo informacional da molécula de xiloglucano de cotilédones de *Hymenaea courbaril* reflete suas funções em nível celular. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas Campinas.
- Tiné, M.A.S., Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S. 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant Science* 154: 117-126.
- Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikel, N.V., Keegstra, K. & Reiter, W.D. 2002. The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 3340-3345.
- Vargas-Rechia, C., Reicher, F., Sierakowski, M.R., Heyraud, A., Driguez, H. & Liénart, Y. 1998. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. *Plant Physiology* 116: 1013-1021.
- York, W.S., Darvill, A.G. & Albersheim, P. 1984. Inhibition of 2,4-D-stimulated elongation of pea and stem by a xyloglucan oligosaccharide. *Plant Physiology* 75: 295-297.