UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DÉBORA CHAVES COELHO LEITE

Modificações da parede celular durante a
formação de aerênquima em raízes de
cana-de-açúcar

Cell wall modifications during aerenchyma formation
in sugarcane roots

SÃO PAULO

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DÉBORA CHAVES COELHO LEITE

Modificações da parede celular durante a
formação de aerênquima em raízes de
cana-de-açúcar

Cell wall modifications during aerenchyma formation
in sugarcane roots

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Versão corrigida (original se encontra disponível no IB-USP)

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

SÃO PAULO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Débora Chaves Coelho

Modificações da parede celular durante a formação de aerênquima em raízes de cana-de-açúcar

106 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. aerênquima 2. cana-de-açúcar 3. parede celular

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a) Dr(a).

Prof(a) Dr(a).

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge
Orientador

Aos meus pais, Renato e Brenda,
pela minha educação e por serem meus maiores exemplos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge, pela orientação, pela confiança e, especialmente, por tudo que me ensinou.

Ao Prof. Dr. Michael Hahn, por ter me acolhido em seu laboratório e colaborado de forma excepcional para este trabalho; a seus pós-docs Utku e Siva, pela grande ajuda e amizade; a seus técnicos Ginny, Sindhu e Jeff e a todo seu grupo, pelo carinho e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Gregório Ceccantini e ao Laboratório de Anatomia Vegetal, pelo espaço e equipamentos cedidos, e aos técnicos Gisele, Tássia e Irwandro, pela pronta ajuda.

À Prof. Dra. Eny Floh e ao Laboratório de Biologia Celular de Plantas, em especial à técnica Amanda, pelo apoio com a microscopia de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro e ao Laboratório de Biologia Celular e Microscopia Eletrônica e Confocal, por permitir completar as análises de MET, e ao técnico Waldir, pela ajuda e paciência.

À Sandra e ao João Grandis, pelas plantas cedidas e pelo carinho que sempre nos recebem em sua casa.

Às amigas Amanda, Adriana, Eveline, Bruna e Rayane pelo apoio diário, auxílios científicos ou não, companheirismo e pelas muitas risadas que fazem cada dia valer a pena.

À Thalita, ao Augusto e à Cris por terem me ajudado enquanto estiveram no lab e feito esses dias muito divertidos.

Aos ICs Vinícius e Ana, pelas ajudas nas coletas e por completarem tão bem esse grupo tão animado.

Às queridíssimas técnicas Eglee e Viviane, pela imensa ajuda em tudo, por nos proporcionarem um local organizado e agradável de se trabalhar e pela grande amizade.

Aos meus pais Brenda e Renato, por darem todo o apoio em mais uma fase concluída e pelo amor, carinho, compreensão e paciência.

Aos meus irmãos Daniel e Sérgio e suas namoradas Juliana e Selma, por sempre estarem ao meu lado.

Ao Diogo, por sempre me ouvir, por me fazer ver as coisas por outros ângulos, por me confortar, por me fazer crescer e, acima de tudo, pelo seu amor e carinho.

À secretaria e ao programa de pós-graduação do Instituto de Biociências da USP e a todos os funcionários que permitem o desenvolvimento da pesquisa.

À Fapesp pela bolsa concedida (Processo nº 2010/12833-9).

ÍNDICE

1. RESUMO	13
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUÇÃO	15
CANA-DE-AÇÚCAR E ETANOL NO BRASIL	15
ETANOL CELULÓSICO	16
PAREDE CELULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR	18
FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA	21
4. OBJETIVO	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
CULTIVO DAS PLANTAS	28
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA	28
DETECÇÃO <i>IN SITU</i> DE MORTE CELULAR PROGRAMADA	30
FRACIONAMENTO DA PAREDE CELULAR	31
PERFIL DE MONOSSACARÍDEOS NEUTROS	32
PERFIL DE OLIGOSSACARÍDEOS	33
PERFIL GLICÔMICO	33
IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	35
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E IMUNOLOCALIZAÇÃO COM OURO COLOIDAL	38
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
6. RESULTADOS	39
CARACTERIZAÇÃO DO AERÊNQUIMA	39
DETECÇÃO <i>IN SITU</i> DA MORTE CELULAR PROGRAMADA	41
COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR DURANTE A FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA	43
ANÁLISE DO PERFIL DE MONOSSACARÍDEOS NEUTROS	44
ANÁLISE DO PERFIL DE OLIGOSSACARÍDEOS	47
PERFIL GLICÔMICO: REAÇÕES DE ANTICORPOS COM EPÍTOPOS DA PAREDE CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO	55
IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	59
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E IMUNOLOCALIZAÇÃO COM OURO COLOIDAL	72

<u>7. DISCUSSÃO</u>	<u>77</u>
FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM CANA-DE-AÇÚCAR	77
CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)	79
MODIFICAÇÕES BIOQUÍMICAS E CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR	81
XILOGLUCANOS	82
XILANOS	85
B-GLUCANO	86
PECTINAS	88
<u>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS</u>	<u>90</u>
<u>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>93</u>
<u>10. ANEXOS</u>	<u>99</u>

1. Resumo

Uma alternativa para aumentar a produção de bioetanol por área de cana plantada no Brasil seria utilizar os resíduos de sua biomassa para conversão em etanol. O conhecimento de como processos de degradação da parede celular se dão em plantas usadas para a produção de bioenergia e a compreensão de como eles funcionam pode ser de grande utilidade para esta tecnologia. Na investigação da anatomia de cana encontramos evidências da formação de um aerênquima lisígeno na raiz de cana, espaços gasosos no córtex da raiz decorrentes da morte celular e degradação da parede. Assim, decidiu-se aprofundar os estudos neste sistema através de técnicas de bioquímica de parede celular, microscopia de luz e transmissão e imunolocalização. A formação do aerênquima nas raízes de cana-de-açúcar tem início com a morte celular programada e a degradação de β -glucano e pectinas, principalmente daquelas associadas às lamelas médias, resultando na separação das células. As hemiceluloses arabinoxilano e xiloglucano mostram apenas modificações em suas estruturas finas, mas permanecendo nas paredes. Além disto, foram observados em microscopia de transmissão alguns pontos onde houve a degradação completa de parede celular, porém a presença de diversas paredes celulares colapsadas nas lamelas entre o aerênquima e ao seu redor parece ser mais importante para a formação do aerênquima. As modificações dos polissacarídeos estão possivelmente associadas com a alteração de características físicas das paredes, tornando-as mais suscetíveis a dobras e colapsos, gerando os espaços de gás e lamelas resistentes, que sustentam estes espaços. Mais do que a “degradação da parede celular”, como é tratado em definições de aerênquima, pudemos observar que este fenômeno é resultado de uma sequência de eventos que permitem modificações da parede celular, e não necessariamente a sua completa degradação, resultando na abertura dos espaços gasosos.

2. Abstract

An alternative to increase bioethanol production per area of sugarcane plantation in Brazil would be to use its biomass residue for conversion into ethanol. The knowledge of how cell wall degradation processes occur in plants used for bioenergy production and understanding how they work can be of great use for this technology. Studying the sugarcane anatomy, we found evidences for the formation of a lysigenous aerenchyma in the roots, gas spaces in the root cortex originated from cell death and cell wall degradation. Thus, we decided to deepen the studies in this system using cell wall biochemistry, light and transmission microscopy and immunolabeling. The aerenchyma formation in sugarcane roots starts with programmed cell death and degradation of β -glucan and pectins, especially those from middle lamellae, resulting in cell separation. The hemicelluloses arabinoxylan and xyloglucan only show modifications in fine structure, but they remain in the cell wall. Besides, complete cell wall degradation was observed in a few spots through transmission electron microscopy, although the collapsing of cell walls seems to be more important for aerenchyma formation. Modifications in the polysaccharides are possibly associated with changes in cell wall physical properties, making them more susceptible to folding and collapsing, generating gas spaces and resistant lamellae that support these spaces. Described as “cell wall degradation” in aerenchyma definition in literature, we observed that this phenomenon is the result of a series of events that allow cell wall modifications, and not necessarily its complete degradation, resulting in the formation of gas spaces.

3. Introdução

Cana-de-açúcar e etanol no Brasil

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia e China (Faostat, 2010). Ocupando uma área de nove milhões de hectares, o equivalente a 2% de toda a terra agricultável do país, a produção de cana-de-açúcar chegou próximo a 720 milhões de toneladas em 2010 (Faostat, 2012). No Brasil, a cana é utilizada para a produção de açúcar e etanol em uma proporção de, aproximadamente, 50% cada, mas com alguma variação regida pelos seus valores de venda (Macedo, 2007; Goldemberg *et al.*, 2008).

Hoje, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol, ficando atrás apenas dos EUA, onde este combustível é produzido a partir do milho (RFA, 2012). Porém, o custo do combustível por litro, o balanço entre a energia renovável produzida comparada com a energia fóssil requerida, entre outras particularidades, fazem com que a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil seja muito mais vantajosa e sustentável (Goldemberg, 2010). O grande desenvolvimento tecnológico nos diversos processos envolvidos na produção sucroalcooleira, iniciados desde a implementação do programa Pró-Álcool, faz com que o balanço energético da produção de etanol a partir de cana seja quase dez vezes maior que aquele da produção a partir de beterraba, palha de trigo, milho ou madeira (Goldemberg, 2007; Goldemberg *et al.*, 2008).

As vantagens do uso do etanol como combustível renovável já são reconhecidas em diversas partes do mundo e, para suprir a grande demanda que está surgindo, estima-se que seja necessário dobrar a produção brasileira de etanol em cinco a dez anos, de acordo com Bonomi e col. (2006). Por outro lado, apesar das muitas pesquisas para o melhoramento genético da cana, acredita-se que a capacidade de armazenamento de sacarose nesta planta possa estar chegando a um limite natural, uma vez que o seu armazenamento requer grandes quantidades de água (Buckeridge, 2007).

Visto que pouco pode ser melhorado nos processos industriais e o aumento do conteúdo de sacarose na cana não deve satisfazer as

necessidades, a solução para o aumento da produção de etanol pode ser resultante não apenas do aumento da área plantada de cana-de-açúcar.

Assim, uma alternativa para aumentar a produção de etanol por área de cana plantada seria utilizar os resíduos de sua biomassa (bagaço e palha) para conversão em etanol. Tradicionalmente, o bagaço da cana, que representa um terço da biomassa da planta, é queimado nas usinas para a produção de eletricidade com baixa eficiência (Macedo, 2007). Projeta-se que se apenas o excesso de bagaço, que não é utilizado para processar calor (cerca de 8%), fosse convertido a etanol, haveria um aumento de 2200 litros na produção por hectare, sendo que a produção a partir de sacarose rende 6000 litros na mesma área (Macedo, 2005). Já a palha, que representa mais um terço de sua biomassa, hoje é mantida no campo para decomposição por microrganismos (Cortez *et al.*, 2008). Cinquenta por cento desta pode ser recuperado a baixo custo, sem que haja prejuízo na reincorporação de nutrientes ao solo (Macedo, 2007).

Com este cenário, um importante aumento na produção de bioetanol a partir de cana no Brasil seria possível através do desenvolvimento de tecnologias para a conversão de polissacarídeos presentes nos resíduos do processamento tradicional da cana (folhas, palha e bagaço), que representam dois terços de toda a biomassa produzida (Soccol *et al.*, 2010). O armazenamento de carboidratos na forma de polímeros de parede celular aumenta a concentração de açúcares na planta sem interferir drasticamente no seu metabolismo (Buckeridge *et al.*, 2000a). Estes polímeros podem, então, ser degradados, convertidos em açúcares fermentáveis e transformados em etanol.

Etanol celulósico

A principal abordagem proposta para a conversão de energia contida na biomassa em biocombustível se inicia com o seu pré-tratamento para a separação da lignina do complexo celulose-hemicelulose. O material segue pela hidrólise ácida ou enzimática dos polímeros de carboidratos (celulose e hemiceluloses) e, então, os açúcares liberados são fermentados por microrganismos e convertidos em álcool (Lee, 1997). A hidrólise química da biomassa de cana já é uma metodologia consolidada em condições

laboratoriais, porém sua aplicação em larga escala não é economicamente viável no Brasil, além de gerar resíduos químicos de processamento difícil e custoso. Entretanto, diferentes linhagens de fungos e bactérias capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas estão sendo estudadas por diversos grupos brasileiros na tentativa de caracterizar glicosil hidrolases de microrganismos mais eficientes na conversão dos polissacarídeos a açúcares fermentáveis (Soccol *et al.*, 2010).

O conhecimento sobre a estrutura da parede celular de cana favorece os estudos com enzimas de microrganismos, pois, uma vez conhecidas as ligações glicosídicas a serem quebradas, torna-se mais fácil encontrar as enzimas que mais se adequam à utilização em processos de hidrólise. Por outro lado, as plantas não somente são capazes de produzir as hidrolases de parede celular, mas as produzem em processos inerentes à sua fisiologia. Durante a morte celular programada que ocorre no processo de formação da camada de abscisão em folhas (Sexton & Roberts, 1982), por exemplo, as plantas utilizam programas de expressão gênica controlados endogenamente, os quais permitem a hidrólise controlada e altamente eficiente de suas próprias paredes celulares. Outros sistemas onde ocorre a degradação eficiente da parede celular são os processos de mobilização de reservas de parede em endospermas e cotilédones de plântulas em crescimento (Buckeridge, 2010). Nestes, polissacarídeos hemicelulósicos ou pectínicos são completamente degradados, produzindo monossacarídeos livres que são utilizados como fonte de energia para o crescimento das plântulas. Polissacarídeos como galatomananos e xiloglucanos são degradados completamente a partir de mecanismos controlados por comunicação hormonal entre diferentes partes das plantas, envolvendo mudanças no padrão de expressão gênica e produção de enzimas específicas que atuam em sistemas altamente eficientes (dos Santos *et al.*, 2004; Brandão *et al.*, 2009; Tonini *et al.*, 2010). Tais mecanismos têm sido comparados com outros sistemas em plantas que envolvem modificações da parede celular, como o amadurecimento de frutos, por exemplo, de forma que mecanismos de degradação seriam sistemas evolutivamente derivados em plantas, cujo princípio reside em sistemas de modificação da parede celular para o crescimento, ativos e fundamentais para todas as células vegetais (Buckeridge *et al.*, 2000b; Buckeridge, 2010).

Assim, é possível imaginar que o conhecimento de como estes processos se dão em plantas usadas para bioenergia (como a cana-de-açúcar) e a compreensão de como eles funcionam (que genes são expressos, quais enzimas são produzidas, quando são produzidas, como sua produção é controlada e que alterações acarretam na parede celular), pode ser de grande utilidade em biotecnologia. Uma vez conhecidos os mecanismos que levam a estes processos, poderiam ser investigadas as variedades de cana existentes para a busca daquelas que podem apresentar o processo alterado, assim como serem desenhadas variedades geneticamente modificadas que sejam capazes de modificar ou hidrolisar suas próprias paredes celulares. Com isto, seria possível o desenvolvimento de um pré-tratamento biológico, no qual a própria planta aumentaria a acessibilidade de hidrolases à sua própria parede celular. Estes processos seriam análogos ao amadurecimento de frutos, mobilização de reservas e senescência, que necessitariam melhor compreensão da composição e arquitetura da parede celular para serem eficazes.

Parede celular de cana-de-açúcar

Diversos estudos estão sendo realizados com parede celular de cana-de-açúcar para compreender a sua estrutura lignocelulósica (bagaço, palha e folhas), visando à obtenção de etanol a partir da auto-hidrólise da biomassa (Socol *et al.*, 2010). Com o advento do programa SUCEST-FAPESP, várias sequências de genes relacionados ao metabolismo da parede celular em cana foram categorizadas (Lima *et al.*, 2001). Com base nestes dados, nosso grupo estendeu os estudos e determinou a estrutura química da parede celular de cana (Silva, 2005). Mais recentemente, estudos aprofundados vêm sendo realizados e a estrutura fina da parede em vários tecidos da planta está começando a ser desvendada (de Souza *et al.*, 2012), como descrito a seguir.

De acordo com o modelo proposto por Carpita e Gibeaut (1993), a parede celular das plantas é composta por três classes de polissacarídeos – celulose, hemiceluloses e pectinas, que interagem entre si. Dependendo das proporções entre estas classes e dos tipos polissacarídeos que compõem as hemiceluloses e pectinas, as paredes podem ser classificadas em tipo I, II ou III.

A parede do tipo I, característica de eudicotiledôneas e monocotiledôneas não-comelinóides, é definida como rica em xiloglucano, como sua principal hemicelulose, e em pectinas. Recentemente descoberta em samambaias, a parede do tipo III é composta principalmente por mananos e baixa quantidade de pectinas (Silva *et al.*, 2011). Em contraste às paredes do tipo I e III, a parede celular de cana-de-açúcar, assim como de outras gramíneas, é considerada do tipo II devido às suas principais hemiceluloses serem o glucano de ligação mista ou β -glucano (BG) e o arabinoxilano (AX) e ao domínio pécico ser reduzido. O xiloglucano (XG) é encontrado em baixas concentrações, além de uma quantidade relativamente alta de compostos fenólicos (17-24%) interligando os polissacarídeos, mas não necessariamente na forma de lignina (Silva, 2005).

Como ilustrado na Figura 1, O BG e a celulose são polissacarídeos semelhantes por serem formados por uma cadeia de glicoses (Glc) interligadas por ligações $\beta(1,4)$. Entretanto, enquanto a celulose é uma molécula linear, o BG sofre algumas interrupções de ligações $\beta(1,3)$, o que o caracteriza como uma hemicelulose. O XG, por sua vez, também é um polímero parecido com a celulose, pois é composto de uma cadeia principal de Glc ligadas $\beta(1,4)$, mas este possui ramificações de xiloses (Xil) através de ligações $\alpha(1,6)$, a qual pode ter ramificações com galactose (Gal) ligada $\beta(1,2)$. O AX é composto por uma cadeia principal linear de unidades de Xil unidos por ligações $\beta(1,4)$ e ramificações de arabinoses (Ara) através de ligações $\alpha(1,3)$ a cada 5 a 10 Xil. Também há possibilidade de ramificação com ácido glucurônico, porém isto não foi observado em cana (Crivellari, 2012; de Souza *et al.*, 2012). Este polissacarídeo é conhecido por ter acetilações, que podem interferir na sua hidrólise enzimática, como já demonstrado.

Figura 1: Estruturas químicas dos principais polissacarídeos da parede celular de cana-de-açúcar. **Celulose:** polímero formado por unidades de glicose unidas com ligações β(1,4). **β-glucano:** hemicelulose semelhante à celulose, porém interrompida por ligações β(1,3). **Xiloglucano:** hemicelulose de cadeia principal semelhante à celulose, mas com ramificações de xiloses através de ligações α(1,6), que podem, por sua vez, serem ramificadas com galactose, com ligação β(1,2), e esta com fucose, com ligação α(1,2). **Arabinoxilano:** hemicelulose com cadeia principal de unidades de xiloses com ramificações de arabinoses α(1,3) ligadas; também podem existir ramificações com ácido glucurônico com ligação α(1,6). **Homogalacturonano:** polissacarídeo da classe das pectinas composto por ácidos galacturônicos α(1,4) ligados, com possível metilação. **Ramnogalacturonano:** pectina de cadeia principal formada por ácidos galacturônicos e ramnosas através de ligações α(1,2) e α(1,4); as ramnosas podem apresentar ramificações com arabinogalactano I e/ou arabinogalactano II. Glicose (GLC), xilose (XIL), galactose (GAL), fucose (FUC), arabinose (ARA), ácido glucurônico (AGL), ácido galacturônico (AGA), ramnose (RAM). Modificado de (Buckeridge *et al.*, 2008).

Os principais estudos já realizados com cana-de-açúcar apontam o homogalacturonano (HG) e o ramnogalacturonano-I (RG-I) como principais componentes da pectina. O primeiro é composto por uma cadeia de ácidos galacturônicos unidos por ligações do tipo $\alpha(1,4)$; quando o HG sofre interrupções por unidades de ramnose (Ram), e esta é ramificada com galactanos e arabinanos, é denominado RG-I (Buckeridge *et al.*, 2008). Na parede celular, acredita-se que os polissacarídeos estejam organizados de forma que o AX e uma pequena quantidade de XG estão fortemente associados à celulose, enquanto o BG, as pectinas e AX mais ramificados interagem menos com a celulose (Carpita, 1996; Silva, 2005; Sousa, 2011; de Souza *et al.*, 2012).

Paralelamente aos estudos de composição e estrutura fina, temos buscado processos biológicos que envolvam a degradação da parede celular. Em condições de campo, Sousa (2011) observou a degradação natural da parede celular da palhada por microrganismos ao longo de 12 meses.

Em pesquisa sobre a degradação da parede induzida pela própria planta, Martins (2011) não encontrou a remobilização de polissacarídeos no estudo com folhas senescentes de cana, indicando que não há modificação ou degradação da parede celular, apesar da ocorrência de remobilização de nutrientes e clorofila. Por outro lado, na investigação da anatomia de diversos órgãos de cana, encontramos evidências da formação de aerênquima lisígeno na raiz de cana (Leite *et al.*, 2010). Assim, decidiu-se aprofundar os estudos neste sistema para caracterizar a formação do aerênquima em cana e compreender como a parede celular é alterada no processo.

Formação de aerênquima

O aerênquima na cana-de-açúcar está presente desde a porção pré-apical das raízes e é formado através da morte celular das células do córtex, onde as paredes celulares são modificadas, formando lacunas (Figura 2). Este processo ocorre naturalmente e, como mencionado acima, um aprofundamento no estudo das alterações que acontecem durante a formação desta estrutura pode auxiliar na compreensão da estrutura da parede celular e de sua degradação.

Figura 2: Formação de aerênquima lisígeno em raiz de cana-de-açúcar. Parênquima cortical integral, mais próximo ao ápice radicular **(A)**; início da formação de lacunas do aerênquima (seta) **(B)**; aerênquima completamente desenvolvido, com presença apenas de traços de parede celular conectando o estelo à epiderme, em região mais afastada do ápice **(C)**. Barra=100µm. (retirado de Leite *et al.*, 2010)

De acordo com Esau (1977), o aerênquima é uma adaptação de tecidos parenquimáticos, caracterizado por grandes espaços intercelulares interligados e preenchidos por gases. Aerênquimas podem aparecer em folhas, pecíolos, caules e raízes de monocotiledôneas e eudicotiledôneas. A formação desta especialização pode ter origem lisígena, via lise celular, ou esquizógena, pela separação das células durante o desenvolvimento (Evans, 2003; Smirnoff & Crawford, 2003). A formação do aerênquima ocorre de forma constitutiva ou em resposta adaptativa a um estresse ambiental, como déficit de oxigênio causado por compactação ou alagamento do solo e deficiência temporária de nitrogênio e fósforo em ambientes aeróbios (Dantas *et al.*, 2001). Acredita-se que sua função seja a de melhorar a absorção de água e a respiração, provendo uma via interna para a circulação de oxigênio, além de reduzir o número de células consumidoras deste gás (Dillewijn, 1952; Drew *et al.*, 2000).

Os estudos sobre a formação de aerênquima em raízes têm como modelos o milho e o arroz. Segundo Armstrong e Armstrong (1994), nestas plantas, o aerênquima tem origem lisígena e sua formação se inicia com a morte e lise de células do parênquima cortical localizado próximo ao ápice, formando espaços. À medida que se afastam do ápice, os espaços se tornam maiores, restando apenas poucas “pontes” de células vivas e traços de paredes celulares conectando a epiderme e o estelo (Figura 3).

Figura 3: Secções mostram desenvolvimento de aerênquima (setas) em tecidos de milho de 0,5 dias em meio com 3% de oxigênio **(B)** ou 1µl-1 de etileno **(C)**, mas não em meio com 21% de oxigênio **(A)**. Aerênquima completamente desenvolvido (tecidos de 2,5 dias) é mostrado em meios com 3% de oxigênio **(E)** ou 1µl-1 de etileno **(F)**, mas não em meio com 21% de oxigênio **(D)**. Barra = 100µm. (Retirado de Gunawardena *et al.*, 2001a).

Sabe-se que a formação de aerênquima em milho é induzida por etileno (He *et al.*, 1996a). A hipóxia, causada por alagamento ou compactação do solo, favorece a biossíntese de etileno, o qual age sobre as células do córtex, desencadeando mecanismos de morte celular programada, que resultarão na abertura de espaços gasosos (Drew *et al.*, 1979; Armstrong & Armstrong, 1994; He *et al.*, 1996a). No arroz, a formação do aerênquima pode ser constitutiva ou induzida por etileno, dependendo do cultivar analisado (Justin & Armstrong, 1991; Kawai *et al.*, 1998), mas também ocorre por morte celular programada.

A morte celular programada (MCP) é diferenciada da necrose por desenvolver certos eventos celulares antes da eliminação completa da célula (Drew *et al.*, 1979). Sabe-se que a MCP é disparada com o influxo de cálcio na célula, seguido pela acidificação do citoplasma, perda da integridade do tonoplasto e fragmentação da cromatina (Jones, 2001). Porém, este autor defende que a decisão para a morte celular na formação de aerênquima, ou em outros casos, como na formação de elementos de vaso do xilema, por exemplo, requer que a célula esteja metabolicamente ativa para sintetizar as

hidrolases necessárias para processar seus restos (Figura 4). Estas hidrolases seriam armazenadas no vacúolo e começariam a agir após o rompimento de seu tonoplasto.

Figura 4: Modelo do mecanismo geral de três tipos de morte celular programada (MCP) em plantas. As células integram diversas combinações de sobrevivência e sinais para a decisão de morte e o final que terão seus restos celulares. Este programa tem início muito antes da morte celular. O destino final dos restos celulares é determinado pelo perfil de hidrolases e toxinas inseridas no vacúolo, que são estabelecidas pelo sinal inicial. O processo de MCP é disparado e dois eventos são compartilhados pela maioria das células em MCP: influxo de cálcio e colapso do vacúolo, que marca o começo das modificações dos restos celulares. Os diferentes perfis de hidrolases inseridos no vacúolo determinam a manifestação da morte. No caso dos elementos de vaso do xilema, o protoplasma é autolizado, mas não as paredes secundárias. Durante a formação de aerênquima lisígeno, toda a parede é removida, enquanto os restos celulares na resposta hipersensitiva são mantidos. Este modelo tem a intenção de servir como uma teoria unificadora de vários, mas não de todos os tipos de MCP (retirado de Jones, 2001).

Existem diferenças entre a ordem em que alterações celulares são observadas em milho e arroz. Enquanto no primeiro ocorre a perda da

integridade do tonoplasto, seguida pelo colapso celular (Campbell & Drew, 1983), no segundo a desintegração da parede precede a perda da integridade do tonoplasto (Kawai *et al.*, 1998). Empregando milho como modelo, no trabalho de Gunawardena e col. (2001a), alguns eventos celulares foram observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em quatro estágios sequenciais (Figura 5):

1. Eventos citoplasmáticos: invaginação da membrana plasmática e sua contração da parede celular, presença abundante de vesículas, citoplasma mais elétron-denso em MET, coloração granular dos conteúdos vacuolares e organelas envolvidas por membrana no vacúolo.
2. Eventos nucleares: condensação da cromatina.
3. Retenção de organelas em membranas: são encontrados corpos de diversos tamanhos contendo mitocôndrias intactas, Golgi e outras inclusões.
4. Degradação da parede celular e formação de espaços.

Figura 5: Estágios da morte celular programada (MCP) observados em microscopia eletrônica de transmissão. Estágio 1: **(A)** invaginação da membrana plasmática (seta); **(B)** citoplasma mais elétron-denso (seta). Estágio 2: **(C)** condensação da cromatina. Estágio 3: **(D)** retenção de organelas em membranas. Barras=1µm **(A)**, 200nm **(B)**, 100nm **(C, D)**. (Adaptado de Gunawardena *et al.*, 2001a)

Durante a MCP também ocorre a degradação do DNA a partir do estágio 1 no mesmo trabalho, apesar de mudanças no núcleo só serem observadas mais tarde. A degradação da cromatina em padrões conhecidos é um evento

que pode ser identificado precocemente através da incorporação de nucleotídeos marcados com fluoresceína a quebras em fita simples de DNA através de reação enzimática do teste de TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992). Por este motivo, este teste é utilizado para comprovar a MCP em plantas e outros organismos.

Quanto à degradação da parede celular, definida como estágio 4 por Gunawardena e col. (2001a), alguns trabalhos já identificaram a atividade da enzima celulase na região apical da raiz, antes de qualquer outro sinal, indicando que esta enzima participa do processo de MCP (He *et al.*, 1996b; Saab & Sachs, 1996). Além da atividade da celulase e outros poucos trabalhos sobre enzimas hidrolíticas, apenas Gunawardena e col. (2001b) observaram mudanças da parede celular *in situ* através de anticorpos contra pectinas esterificadas e não-esterificadas (JIM7 e JIM5, respectivamente). Estes autores evidenciaram uma alteração no padrão de ligação do anticorpo JIM5 nos vértices das junções triangulares antes dos estágios de MCP poderem ser observados por MET.

Pesquisas sobre aerênquima em cana-de-açúcar são escassas e, geralmente, associadas a aspectos agrônômicos, como por exemplo, Gilbert e col. (2007). Em estudos realizados em nosso laboratório, foi observada a formação de aerênquima lisígeno desde a porção pré-apical de raízes de cana da variedade SP80-3280 (Leite *et al.*, 2010). Estes eventos se mostraram muito semelhantes aos obtidos com o trabalho de caracterização da MCP de Gunawardena e col. (2001a) (Figuras 2 e 3). Neste trabalho foram observados diferentes estágios de formação de aerênquima na raiz, sendo que a área das lacunas no córtex aumentava quanto mais longe do ápice.

As mudanças citológicas que levam à formação do aerênquima em milho são conhecidas e acredita-se serem semelhantes às aquelas em cana, por pertencerem à mesma família (Poaceae). Porém, pouco se sabe sobre os processos de síntese e ação enzimáticas que levam à degradação da parede celular nestas regiões (Drew *et al.*, 2000).

A obtenção destas informações abre a possibilidade da inserção do mesmo padrão de expressão gênica em outras regiões da cana, como no colmo, por exemplo, para que em um momento oportuno, a própria planta se torne capaz de produzir as enzimas responsáveis pela degradação da parede

celular, liberando açúcares fermentáveis e, conseqüentemente, facilitando a produção de etanol celulósico.

A hipótese discutida neste trabalho é de que, durante a formação do aerênquima nas raízes, as paredes das células do córtex sofrem alterações que permitem a abertura dos espaços gasosos. Isto deve ser acompanhado por mudanças ultraestruturais, características do processo de MCP, como as descritas para milho e arroz na literatura.

Vale ressaltar que o emprego da formação do aerênquima em raízes de cana como objetivo de estudo fornece dados inéditos ao grupo quanto à caracterização da parede celular deste órgão, além de possibilitar o acompanhamento das modificações dos polissacarídeos de maneira gradativa.

4. Objetivo

Identificar os eventos relacionados a modificações na parede celular em cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima em sua raiz.

Objetivos específicos

- Caracterizar histologicamente a topologia da formação de aerênquima na raiz de cana-de-açúcar.
- Identificar a formação lisígena do aerênquima através de morte celular programada.
- Analisar a composição de mono e oligossacarídeos da parede celular nos diferentes estágios de desenvolvimento do aerênquima.
- Localizar os polissacarídeos e comparar seus perfis de ocorrência durante a formação de aerênquima.

5. Material e métodos

Cultivo das plantas

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280, gentilmente cedidas por produtores do Sítio Vitória, localizado na região de Piracicaba, São Paulo.

Porções de colmo de cana-de-açúcar contendo uma gema (toletes) foram cortadas em tamanhos semelhantes (aproximadamente 4 cm com a gema centralizada) e colocadas em bandejas contendo vermiculita, onde permaneceram por aproximadamente 15 dias até o desenvolvimento da gema. As plantas foram transplantadas para vasos de 14 L contendo vermiculita e foi adicionado adubo NPK (30:20:30) à superfície do substrato. As plantas foram regadas diariamente e permaneceram nestes vasos por mais 90 dias.

Após este período, realizou-se a coleta das raízes do perfilho, as quais foram lavadas em água destilada para retirada de resíduos de vermiculita. Foram realizados cortes anatômicos preliminares com os diversos tipos de raízes e foi definido que seriam utilizadas as raízes do perfilho por terem vantagens em relação à padronização, quantidade de massa e manuseio, apesar das raízes do tolete também possuírem aerênquima. Dependendo da análise a ser realizada, as raízes coletadas foram submetidas a diferentes procedimentos, sendo sempre divididas em cinco segmentos de 1 cm cada, com início no ápice (segmento 1) e término a 5 cm do mesmo (segmento 5), como descrito a seguir.

Foram utilizadas raízes de três lotes de plantio, sendo estes iniciados em Novembro de 2010 (1º lote), Abril de 2011 (2º lote) e Abril de 2012 (3º lote).

Caracterização anatômica da formação do aerênquima

Para o estudo anatômico, três raízes de diferentes tamanhos, oriundas de sete plantas do 1º lote foram medidas com paquímetro digital, variando de

1,6 a 43,7 cm. Estas foram mantidas em álcool 70% em dessecador a vácuo e armazenadas a 4°C até a utilização.

A anatomia da raiz foi observada para a identificação do desenvolvimento do aerênquima, correlacionando a formação desta estrutura com a sua distância em relação ao ápice. Para isso, cada raiz foi dividida em segmentos consecutivos de 1 cm, com início no ápice e término a 5 cm do mesmo.

Para a confecção das lâminas, os segmentos da raiz foram transferidos para etanol 50% e, em seguida, foram mantidos em uma série etanol/butanol, de concentração 50 a 100%, por duas horas em cada solução. Após este procedimento, os segmentos foram colocados em butanol 100% por 12 horas em temperatura ambiente e, após nova troca de butanol 100%, por 2 horas em estufa a 58°C.

Para a inclusão em parafina, o material foi colocado em série butanol/parafina com concentrações de parafina crescentes até 100%, sendo mantidos por 3 horas em cada solução, em estufa a 58°C. O emblocamento dos segmentos foi realizado em pequenas caixas de papel preenchidas com parafina líquida, onde os segmentos foram colocados separadamente e mantidos em temperatura ambiente até o endurecimento.

Os materiais foram cortados em micrótomo rotativo Leica (RM2145) e os cortes colocados em lâminas histológicas com adesivo de Bissing, para a aderência. Após a secagem em estufa a 40°C, as lâminas foram colocadas em acetato de butila em banho-maria (60°C) para a desparafinação durante uma hora. Em seguida, as lâminas foram hidratadas até etanol 50%, coradas com Azul de Astra por uma hora, lavadas em etanol 50% por alguns segundos, coradas em Safranina por 40 minutos, desidratadas novamente até etanol 100%, colocadas em solução de acetato de butila/etanol 100%, e em seguida acetato de butila 100%. Após estes procedimentos, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá e cobertas com lamínula e colocadas em estufa para secagem final e posterior observação em microscópio Olympus (BX51).

A partir das fotos, foram medidas as áreas do córtex da raiz (excluindo-se epiderme e exoderme) e dos espaços de gás, utilizando o programa Image-Pro® (MediaCybernetics, v.6.3). Desta forma, os resultados são apresentados em porcentagem de aerênquima presente no córtex. Foi utilizada a média de

dois cortes de cada segmento para representar a porcentagem de aerênquima naquela amostra.

Detecção *in situ* de morte celular programada

A detecção da morte celular programada foi realizada por meio do teste de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling), que incorpora nucleotídeos marcados com fluoresceína a quebras em fita simples de DNA ("nicks") através de reação enzimática (Gavrieli *et al.*, 1992). A incorporação destes nucleotídeos permite a visualização dos núcleos de células em morte celular programada através de microscópio de fluorescência.

O ensaio foi realizado partindo-se de raízes do 3º lote, dividindo-as em segmentos, como o descrito para a caracterização histológica do aerênquima, porém apenas um ensaio foi realizado com sucesso para os cinco segmentos. Os segmentos foram fixados em formalina neutra tamponada (formaldeído 3,7% em tampão bifosfato 0,1M pH 7), desidratados em série etanólica até concentração de 50% por 2 horas em cada passo. As amostras passaram pelo mesmo processo de inclusão em parafina descrito acima e foram cortadas em micrótomo rotativo Leica (RM2145). Os cortes foram colocados em lâminas histológicas com adesivo de Haupt para aderência. Após a secagem em estufa a 40°C, as lâminas foram desparafinadas em acetato de butila em banho-maria (60°C) por uma hora.

O teste de TUNEL foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante do kit (Roche Applied Science). Um controle negativo foi conduzido em cada segmento utilizando apenas a solução contendo nucleotídeos marcados, mas sem a enzima, assim como um controle positivo, no qual os cortes foram incubados com DNase I (Roche Applied Science) antes do ensaio padrão.

Após o ensaio, os cortes foram observados em microscópio de fluorescência (Zeiss Imager.M2 AX10) com câmera acoplada (AxioCam HRc) e fotografados através do programa AxioVision (Rel. 4.8) em condições iguais de exposição. Os núcleos foram realçados utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) para melhor identificação.

Fracionamento da parede celular

Para a extração dos diferentes componentes das paredes celulares, as raízes dos perfilhos das plantas do 1º lote foram divididas em segmentos consecutivos de 1 cm a partir do ápice como descrito anteriormente. Para a obtenção de massa suficiente para esta análise, cada amostra foi composta com raízes de 20 plantas. Foram utilizadas cinco réplicas biológicas por segmento, totalizando uma amostragem de 100 plantas. As amostras foram congeladas, liofilizadas e pulverizadas em graal e pistilo utilizando nitrogênio líquido.

O fracionamento das paredes celulares foi feito de acordo com o procedimento desenvolvido por Gorshkova e col. (1996) e adaptado por Silva (2005), utilizando uma massa seca inicial de 150 mg por réplica.

Remoção dos açúcares solúveis

Para a retirada dos açúcares solúveis, cada amostra foi submetida à extração com etanol 80% (6 mL.mg^{-1}) a 80°C por 20 minutos, seguida de centrifugação ($3.220 \times g$ por 10 minutos) e descarte do sobrenadante. Esta etapa foi repetida cinco vezes até a retirada completa dos açúcares solúveis (Silva, 2005), confirmada pelo método fenol-sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956).

Remoção de compostos fenólicos

Com a finalidade de remover compostos fenólicos da parede celular (diferulatos e lignina), foi efetuada extração com uma solução clorito de sódio (NaClO_2) e ácido acético ($31,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3,75 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente) a partir do material remanescente da remoção de açúcares solúveis de acordo com Carpita (1984). O material foi incubado a 65°C por uma hora e agitado manualmente a cada dez minutos. Após este procedimento, foram adicionados aos tubos mais 200 mg de NaClO_2 e 75 μL de ácido acético glacial e o material permaneceu incubado por mais uma hora. Em seguida, o material foi centrifugado ($3.220 \times g$ por 10 minutos). O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado ($3.220 \times g$ por 10 minutos) por cinco vezes e, em seguida, congelado e liofilizado.

Extração de pectinas

As pectinas foram extraídas adicionando ao resíduo obtido na etapa anterior 20 mL de solução de oxalato de amônio 0,5% (m/v pH 7,0) a 80°C por 3h, sob agitação. Após centrifugação (3.220 x *g* por 10 minutos), o sobrenadante foi reservado e o processo foi repetido, juntando-se os sobrenadantes ao final. O precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado (3.220 x *g* por 10 minutos) por três vezes para a retirada do reagente. O resíduo foi congelado e liofilizado.

Extração de hemiceluloses

O precipitado resultante da extração dos polissacarídeos mais solúveis foi extraído duas vezes com 20 mL de NaOH 0,1M, contendo boroidreto de sódio (3 mg/mL) por uma hora em temperatura ambiente. A cada extração, o material foi centrifugando (3.220 x *g* por 20 minutos), reservando o sobrenadante em seguida. O mesmo procedimento foi repetido com as concentrações de NaOH 1M e 4M. Os sobrenadantes obtidos e o resíduo após as extrações foram neutralizados utilizando ácido acético glacial e reservados.

Todas as frações obtidas foram dialisadas em membranas com exclusão de pesos moleculares de 12.000 Da. As diálises foram feitas por 12h em água corrente seguidas de quatro trocas em água destilada a cada 2h. Em seguida, o dialisado foi congelado e liofilizado. A massa de cada uma das frações da parede foi obtida gravimetricamente.

Perfil de monossacarídeos neutros

Dois miligramas de cada uma das frações foram hidrolisados com 100 µL de H₂SO₄ 72% (v/v) a 30°C por 45 minutos. O ácido foi diluído a 4% (v/v) adicionando-se água deionizada e o material foi autoclavado a 120°C por uma hora (1 atm) (Saeman *et al.*, 1945). As amostras foram neutralizadas com NaOH e dessalinizadas em colunas de troca iônica (Dowex® - Dow Chemical, SP, Brasil). As soluções foram congeladas, liofilizadas e ressuspensas em 1 mL de água deionizada para análise em cromatografia líquida.

A composição dos monossacarídeos neutros foi determinada por cromatografia líquida de troca iônica de alta performance com detector de pulso

amperométrico (HPEAC/PAD) em um sistema Dionex DX-500 utilizando uma coluna CarboPac SA10. Os monossacarídeos foram separados isocraticamente em 0,6mM de NaOH com fluxo de 1 mL.min⁻¹. Para produzir condições adequadas para detecção, foi utilizada uma pós-coluna com NaOH 500mM com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Os açúcares foram separados em 27 minutos.

Perfil de oligossacarídeos

Cada uma das frações obtidas no fracionamento da parede celular foi diluída a 1 mg/mL em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 e foram utilizados como substrato para digestão enzimática utilizando xilanase (Sigma®), liquenase (Megazyme®) ou GH12 xiloglucano endoglucanase (XEG), purificada de acordo com Damásio e col. (2012). Todas as enzimas foram utilizadas na concentração de 0,5 U e os ensaios foram realizados em banho-maria a 30°C por 24h e a reação foi parada por desnaturação da enzima com fervura por cinco minutos (de Souza *et al.*, 2012). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro Millipore (mesh 20µm) para a posterior análise dos oligossacarídeos em HPEAC/PAD (sistema Dionex ICS-3000) com coluna CarboPac PA-100 utilizando NaOH 88mM e acetato de sódio 200mM como eluente (0,9 mL.min⁻¹) por 45 minutos. Os picos gerados após a digestão foram identificados de acordo com o descrito em de Souza e col. (2012).

Perfil glicômico

Os anticorpos utilizados no perfil glicômico foram agrupados de acordo com a base de dados Plant Cell Wall Monoclonal Antibody Database (WallMabDB), desenvolvida pelo grupo do Dr. Michael Hahn do Complex Carbohydrate Research Center da Universidade da Geórgia (EUA). Nesta base de dados, há a quantificação da ligação de anticorpos da série CCRC, JIM, LM, entre outros, com 54 tipos de polissacarídeos extraídos de diversas plantas. Através destes dados, foi possível agrupar os anticorpos de acordo com o tipo de polissacarídeo com o qual reagiram. São estes: xiloglucanos não-fucosilados (non-fuc XG), xiloglucanos fucosilados (fuc XG), xilanos (xylan),

galactomananos (galactomannan), manano acetilado (acetylated mannan), β -glucano (β -glucan), cadeia principal de homogalacturonano (HG backbone), cadeia principal de ramnogalacturonano-I (RG-I backbone), ramnogalacturonano-I de mucilagem de linhaça (Linseed mucilage RG-I), ramnogalacturonano-I/arabinogalactano (RG-I/AG) e arabinogalactano (AG); cada grupo também pode estar subdividido. Os resultados da base de dados e a técnica do perfil glicômico estão publicados em Pattathil e col. (2010).

Antes do ensaio, foi determinado o teor de açúcares totais das amostras para que fossem normalizadas, ou seja, para que cada amostra submetida ao ensaio de ELISA tivesse a mesma concentração de açúcares.

Dosagem de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pela técnica do fenol-sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). Uma curva padrão também foi feita utilizando diferentes concentrações de D-Glucose (5 a 50 μ g) para cálculo de glicose-equivalente nas amostras. Com base na estimativa da quantidade de açúcar, as frações de parede celular foram diluídas para uma concentração de 60 μ g.mL⁻¹ para a realização do perfil glicômico.

Ensaio do perfil glicômico

Das amostras diluídas, foram colocados 50 μ L por poço de cada solução, sendo que cada amostra estaria presente em 156 poços para a hibridização com os 156 anticorpos. As placas ELISA foram colocadas em estufa ventilada a 37°C para secagem por 12 horas.

Para bloquear espaços inespecíficos dos poços, foram adicionados 200 μ L de tampão de bloqueio (solução 1% de leite em pó desnatado em tampão TBS (Tris-NaCl 0,1M)) por poço e as placas foram incubadas por uma hora. O tampão de bloqueio foi então retirado e 50 μ L dos anticorpos primários (Anexo 1) foram adicionados, de forma que todas as amostras fossem hibridizadas contra todos os anticorpos. Após uma hora de incubação, o anticorpo foi descartado e os poços foram lavados três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem (tampão de bloqueio diluído 10 vezes em tampão TBS).

Adicionou-se então 50 μ L por poço de anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma-Aldrich) nos poços em que foram utilizados anticorpos

primários BG-1 e LAMP e da série CCRC; para as séries JIM e MAC, utilizou-se o anticorpo secundário anti-rato (Sigma-Aldrich). Ambos os anticorpos foram diluídos de acordo com as instruções do fabricante. Após uma hora de incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 300 µL de tampão de lavagem. Para a reação poder ser observada, foi efetuada incubação por 20 minutos com 50 µL por poço do substrato TMB Peroxidase (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA). A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL por poço de ácido sulfúrico 0,5N. Imediatamente após o término da reação, as absorbâncias foram lidas a 450nm em leitora de Elisa (Bio-Rad 680). Com os valores de absorbância, foram gerados mapas do perfil glicômico através do programa R (R development core team, 2006).

Imunolocalização de polissacarídeos

A partir dos resultados obtidos no perfil glicômico foram escolhidos anticorpos para a imunolocalização dos polissacarídeos. Em cada grupo de polissacarídeos, observou-se a intensidade da reação cruzada dos anticorpos, tanto visualmente, quanto a partir dos valores de absorbância, e os padrões de variação entre os segmentos e entre as frações. Para a escolha dos anticorpos, foi dada preferência àqueles que tiveram maior resposta de ligação ao material e/ou que tiveram alguma variação ao longo dos segmentos. Foi escolhido pelo menos um anticorpo de cada grupo para ser testado na imunolocalização. Os anticorpos dos grupos que não tiveram resposta no perfil glicômico não foram utilizados nesta etapa (Tabela 1).

O preparo do material foi realizado de acordo com Avci e col. (2012). Para isso, segmentos de raízes do 2º lote foram fixados em paraformaldeído-glutaraldeído e infiltrados em resina LR White (Ted Pella, Inc.). Após a polimerização, foram feitas secções ultrafinas (250 nm) em ultramicrotomo (Leica EM UC6). As secções foram transferidas para lâminas próprias para o procedimento (Fisherbrand – Superfrost Plus).

Para a imunolocalização, os espaços inespecíficos foram bloqueados utilizando uma gota de solução de leite em pó desnatado 3% (m/v) em tampão KPBS (10mM pH7,1 com 0,5M NaCl) em cima das secções por 30 minutos. Em seguida, esta solução foi retirada e, então, foi aplicada uma gota do anticorpo

primário, que permaneceu por uma hora para incubação. As secções foram lavadas três vezes com tampão KPBS seguido pela aplicação do anticorpo secundário adequado (Alexa Fluor 488 IgG anti-camundongo ou Alexa Fluor 488 IgG anti-rato) diluído 1:100 no mesmo tampão e incubação por uma hora. Para finalizar, as secções foram lavadas cinco vezes com tampão KPBS e montadas em meio de montagem Citifluor antifadent (Electron Microscopy Sciences) e cobertas com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon (Eclipse 80i) e fotos das secções foram tiradas usando o programa NIS-Elements Basic Research.

Tabela 1: anticorpos utilizados para a imunolocalização de polissacarídeos. XG - xiloglucano; HG - homogalacturonano; RG - ramnogalacturonano.

Grupo de polissacarídeo	Anticorpo
XG não-fucosilado 1	CCRC-M95
XG não-fucosilado 2	CCRC-M87
XG não-fucosilado 3	CCRC-M100
XG não-fucosilado 4	CCRC-M58
XG fucosilado	CCRC-M84
Xilano 3	CCRC-M114
Xilano 4	CCRC-M154
Xilano 5	CCRC-M144
	CCRC-M155
Xilano 6	CCRC-M153
	CCRC-M139
	CCRC-M138
Xilano 7	CCRC-M160
	CCRC-M149
B-glucano	BG1
HG Backbone 1	CCRC-M131
	CCRC-M38
HG Backbone 2	JIM7
RG-I Backbone	CCRC-M14
	CCRC-M35
Linseed Mucilage RG-I	CCRC-M164
RG-Ib	JIM137
RG-Ic	CCRC-M23
RG-I/Arabinogalactano	CCRC-M80
	CCRC-M13
	CCRC-M7
	CCRC-M121
	CCRC-M22
	CCRC-M8
Arabinogalactano 1	MAC204
Arabinogalactano 2	JIM14
	JIM19
	CCRC-M107
Arabinogalactano 3	JIM17
Arabinogalactano 4	JIM13

Microscopia eletrônica de transmissão e imunolocalização com ouro coloidal

Para a MET, foi utilizado o mesmo material emblocado em LR White da imunolocalização. Foram feitas secções de 80 nm (micrótomo Leica EM UC6), as quais foram coradas com acetato de urânio 2% por 5 minutos e citrato de chumbo de Reynold por 1 minuto.

A imunolocalização conjugada com ouro coloidal foi realizada apenas nos segmentos 4 e 5. Para isto, secções de 80 nm foram incubadas em BSA (bovine serum albumin) 5% em tampão KPBS 10 mM por 30 minutos. As secções foram incubadas em anticorpos CCRC-M154, BG1, CCRC-M7 e CCRC-M38 por uma hora, seguido pela lavagem com tampão KPBS 10 mM por 30 segundos. Em seguida, as secções foram incubadas em anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 IgG anti-camundongo) conjugado com ouro coloidal 15 nm diluído 1:10 em tampão KPBS 10 mM. As secções foram lavadas por 30 segundos em tampão KPBS e água destilada.

Apenas as secções dos segmentos 4 e 5 foram observadas em microscópio de transmissão Zeiss 902A (na Universidade da Geórgia) e todos os segmentos foram observados em microscópio de transmissão EM900 (IB/USP), ambos operados a 80 kV.

Análises estatísticas

Os dados referentes à área do aerênquima, rendimento das frações e perfil de monossacarídeos foram submetidos à análise estatística pelo método ANOVA one-way, com $\alpha=0,05$. Quando houve contraste entre as médias, foi realizado o teste *post-hoc* Tukey HSD, com significância de 5%. Estas análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico JMP[®] *Statistical Software*, versão 5.0.1.

6. Resultados

O sistema radicular da cana-de-açúcar é composto por raízes que emergem do tolete e por aquelas que emergem da base dos novos perfilhos (Figura 6). As raízes do tolete são as primeiras a se desenvolver, emergindo poucos dias após o início do cultivo. Estas são, inicialmente, finas e esbranquiçadas e, com o desenvolvimento da planta, adquirem coloração marrom. As raízes dos perfilhos, porém, emergem depois do desenvolvimento da nova planta e são facilmente distinguidas das outras por serem mais grossas e brancas e estão presentes em menor quantidade. Ambos os tipos de raízes desenvolvem aerênquima no córtex.

Figura 6: **(A)** Esquema do sistema radicular de cana-de-açúcar, retirado de Smith e col. (2005) evidenciando os tipos de raízes e o local de onde emergem. **(B)** Sistema radicular de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, evidenciando os dois tipos de raízes presentes.

Caracterização do aerênquima

Na Figura 7, observa-se que, independentemente do comprimento da raiz, a formação do aerênquima tem início a partir de 1 cm do ápice (segmento 2). Nesta região, é observada a degradação de algumas paredes de células

periféricas, próximas ao cilindro esclerenquimatoso, geralmente na quarta camada de células abaixo da epiderme (Figura 7 C). A área dos espaços de ar representa cerca de 6% da área do córtex nesta região e aumenta gradativamente com a degradação centrípeta de paredes celulares até a região do segmento 5, quando representa cerca de 40% da área do córtex (Figura 7 E e F). A partir desta região e em locais mais distantes do ápice considerou-se que o aerênquima está em sua forma mais desenvolvida, pois não foram observadas grandes alterações desta área nos centímetros seguintes.

Ao longo do desenvolvimento do aerênquima, há uma tendência de degradação das paredes periclinais, de maneira que os espaços de ar são formados radial e centripetamente. Os espaços são separados entre si por paredes remanescentes, além de raios de células íntegras, em alguns locais (indicado por “a” na Figura 7 F). Em geral, as três camadas de células mais externas – epiderme, exoderme e cilindro esclerenquimatoso – não são degradadas, assim como a endoderme, que permanece intacta mesmo após o desenvolvimento completo do aerênquima, mantendo-o restrito ao córtex (Figura 7 F). Por isso, com os resultados obtidos, os espaços de ar ocupariam em média 40% da secção transversal do córtex no aerênquima desenvolvido.

Figura 7: **(A)** Desenvolvimento do aerênquima a partir do ápice até 5 cm. Os números acima das barras mostram a porcentagem média da área da seção transversal ocupada por aerênquima no córtex. Barras = erro padrão. Os números do eixo x mostram a distância em relação ao ápice. **(B – F)** Cortes histológicos transversais. Ápice da raiz com as células inteiras: tecidos periféricos compostos por epiderme, exoderme e cilindro esclerenquimatoso (*pe*), seguido pelo córtex (*co*), endoderme (*en*) e cilindro vascular (*cv*) (marcados em **B**). A degradação das paredes celulares se inicia em células mais periféricas (asteriscos em **C** e **D**) e evolui em direção ao cilindro esclerenquimatoso (setas em **E** e **F**); a partir da região entre 4 e 5cm de distância do ápice até a base da raiz se considera que o aerênquima esteja completamente desenvolvido (**F**); os espaços de ar são separados entre si por paredes não degradadas e raios de células íntegras (indicado por “a” em **F**) (barra=20 μ m).

Detecção *in situ* da morte celular programada

A morte celular programada nas células das raízes de cana-de-açúcar se inicia a partir do segmento 2 em todas as regiões do córtex e também do cilindro vascular (Figura 8 E). O número de núcleos marcados tem um pico no segmento 3 (Figura 8 H), onde há uma leve tendência de concentração na região mais próxima do cilindro vascular, e diminui gradativamente nos segmentos 4 e 5 (Figura 8 K e N), onde esta tendência não é tão proeminente.

Nota-se, nos dois últimos segmentos, que a maior quantidade de núcleos marcados está nos locais onde o aerênquima está menos desenvolvido.

Figura 8: Detecção da morte celular programada por meio do teste de TUNEL. Os núcleos das células em morte celular programada são marcados nos segmentos 2, 3, 4 e 5 (E, H, K e N, respectivamente). O controle positivo (C, F, I, L e O) de cada segmento indica onde há núcleo. O controle com coloração de safrablau (A, D, G, J e M) indica a região aproximada do corte de cada segmento. Os núcleos detectados pelo teste de TUNEL e os do controle positivo foram coloridos artificialmente em vermelho e azul, respectivamente de modo a melhorar a visualização dos pontos. Os números acima à direita indicam a quantidade de núcleos marcados. As imagens dos controles negativos que indicam que a marcação do teste não é inespecífica e a figura sem alteração estão no Anexo 1. Barra=400µm. Os cortes são de regiões imediatamente adjacentes, de forma que se pode sobrepor os controles e os tratados com um alto grau de confiança em relação à similaridade.

Composição da parede celular durante a formação do aerênquima

Os rendimentos de cada uma das frações obtidas após fracionamento da parede celular de cada segmento estão demonstrados na (Figura 9).

Figura 9: Rendimentos médios das frações por segmento de raiz (n=5). Barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os segmentos.

Na fração obtida por extração com clorito de sódio, observa-se que o segmento 1 se destaca por apresentar o maior rendimento (38%) entre os diferentes segmentos. Por outro lado, o segmento 5 apresenta o menor rendimento (13,5%), enquanto os segmentos 2, 3 e 4 não são diferentes entre si. A diferença entre os rendimentos dos segmentos na fração oxalato de amônio ocorre apenas entre o ápice (segmento 1) e o restante da raiz. Os segmentos 2, 3, 4 e 5 são estatisticamente iguais. As frações de NaOH apresentam tendências similares de menor rendimento para o segmento 1 e rendimentos semelhantes nos demais segmentos. O rendimento do segmento 1 na fração resíduo é menor que aqueles dos outros segmentos (17%). Entre os segmentos 2, 3, 4 e 5 há um aumento considerável no rendimento à medida que aumenta a distância do ápice, variando de 34%, no segmento 2, a 42%, no segmento 5.

Análise do perfil de monossacarídeos neutros

O perfil de monossacarídeos neutros de cada uma das frações é apresentado na Tabela 2. Diferenças entre os segmentos são observadas em apenas alguns monossacarídeos, principalmente naqueles presentes em maior porcentagem, como Ara, Gal, Glc e Xil. Manose (Man) representa aproximadamente 3% da fração clorito de sódio e é menor nas frações seguintes, porém não apresenta diferença entre os segmentos, indicando que polissacarídeos ricos em mananos, como o glucomanano, são encontrados em concentração muito baixa na parede celular de cana. Fucose (Fuc) é detectada em baixas proporções, ultrapassando 1% em poucas amostras.

A fração clorito de sódio é composta em quase sua totalidade por Ara, Gal, Glc e Xil, sendo apenas este último monossacarídeo diferente estatisticamente entre os segmentos, mostrando um aumento de sua proporção em direção ao segmento 5. Em relação à Ara, observa-se uma tendência de aumento, ao passo que Gal e Glc exibem uma tendência contrária. O mesmo padrão de alterações é observado na fração oxalato de amônio, porém apenas Gal apresenta diferença significativa entre os segmentos.

Estas frações são ricas em pectinas, como os RG-I e arabinogalactanos (AG), devido à presença de Ara e Gal. O monossacarídeo Glc indica a presença de BG. As proporções de Ara, Gal e Glc indicam que as quantidades de pectinas e BG diminuem em direção ao segmento 5. A Xil nestas frações sugere que podem ter sido liberados XG e AX menos solúveis, provavelmente com maior grau de substituições, os quais aumentam com o desenvolvimento da raiz.

Na fração NaOH 0,1M, as diferenças nas proporções de Ara são pequenas, sendo este monossacarídeo então considerado constante. Gal, Glc e Xil mostram diferenças significativas: em Gal, os segmentos 2 e 4 são diferentes entre si, mostrando uma tendência de diminuição no sentido do segmento 5; em Glc, apenas o segmento 2 é diferente dos outros, mas também há uma tendência de diminuição de sua proporção; em Xil, o segmento 2 é diferente de 4 e 5, mostrando um aumento deste monossacarídeo.

A diferença de proporções de Ara na fração NaOH 1M é pequena, sendo no máximo 2% entre os segmentos 3 e 4, o que não caracteriza uma variação. Em Gal, existe diferença significativa apenas entre os segmentos 1 e 4, sendo que a proporção deste monossacarídeo decresce em direção ao segmento 5. Observa-se ainda uma redução da proporção de Glc e um aumento da proporção de Xil.

Todos os monossacarídeos apresentaram diferenças significativas entre os segmentos na fração NaOH 4M, exceto por Fuc. Ara mostra uma diminuição de proporção que é significativa entre os segmentos 1 e 4. Os segmentos 1, 2 e 4 são diferentes entre si no monossacarídeo Gal, indicando uma tendência de diminuição de proporção. Em Glc, apenas os segmentos 2 e 5 são diferentes entre si, também mostrando diminuição na proporção. Xil aumenta dos segmentos 1 e 2 para o segmento 5, ao contrário do observado para Gal e Glc. De forma geral, nas frações de NaOH, as pectinas e BG também diminuem, enquanto o AX aumenta e, provavelmente, se torna cada vez menos ramificado, com o desenvolvimento da raiz.

No resíduo, há predominância do monossacarídeo Glc que perfaz no mínimo 96,3% da fração, embora haja presença de Xil, Ara e Gal em baixas proporções.

Tabela 2: Perfil dos monossacarídeos neutros nas frações. Valores indicam a porcentagem de cada monossacarídeo por segmento (n=5) $\pm$ erro padrão. Letras indicam diferenças significativas entre os segmentos ($p < 0,05$).

		Fucose	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose
Clorito de sódio	S1	1,3 $\pm$ 0,2	12,5 $\pm$ 1,8	20,3 $\pm$ 1,6	38,0 $\pm$ 3,4	23,4 $\pm$ 1,2 A	2,9 $\pm$ 0,8
	S2	0,9 $\pm$ 0,3	15,9 $\pm$ 1,3	15,7 $\pm$ 1,2	36,8 $\pm$ 4,3	27,7 $\pm$ 2,0 ABC	3,0 $\pm$ 0,8
	S3	1,3 $\pm$ 0,4	17,3 $\pm$ 1,7	15,8 $\pm$ 0,7	40,2 $\pm$ 4,0	24,8 $\pm$ 2,6 ABC	3,0 $\pm$ 0,8
	S4	0,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,6	15,7 $\pm$ 0,6	31,7 $\pm$ 1,1	33,3 $\pm$ 1,4 C	2,0 $\pm$ 0,1
	S5	1,2 $\pm$ 0,2	18,3 $\pm$ 1,4	16,9 $\pm$ 2,2	28,8 $\pm$ 2,0	32,3 $\pm$ 2,4 BC	2,4 $\pm$ 0,4
	p	0,4477	0,0793	0,1289	0,1091	0,0067	0,7320
Oxalato de amônio	S1	0,5 $\pm$ 0,3	12,3 $\pm$ 0,8	12,2 $\pm$ 1,3 A	49,8 $\pm$ 2,6	24,4 $\pm$ 1,4	0,7 $\pm$ 0,2
	S2	0,9 $\pm$ 0,3	12,6 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 0,4 AB	45,9 $\pm$ 2,7	26,1 $\pm$ 6,9	6,5 $\pm$ 5,9
	S3	0,5 $\pm$ 0,2	13,7 $\pm$ 0,9	9,4 $\pm$ 1,4 AB	49,9 $\pm$ 3,3	23,9 $\pm$ 6,7	0,1 $\pm$ 0,1
	S4	0,9 $\pm$ 0,4	13,6 $\pm$ 1,0	8,5 $\pm$ 0,8 AB	38,3 $\pm$ 2,3	31,4 $\pm$ 7,9	6,5 $\pm$ 6,5
	S5	0,9 $\pm$ 0,3	15,4 $\pm$ 2,3	6,3 $\pm$ 1,2 B	41,6 $\pm$ 5,0	34,6 $\pm$ 3,4	0,0 $\pm$ 0,0
	p	0,7152	0,5030	0,0149	0,0940	0,6286	0,5638
NaOH 0,1M	S1	1,5 $\pm$ 1,0	22,1 $\pm$ 1,6	12,0 $\pm$ 1,3 AB	21,8 $\pm$ 2,1 A	40,5 $\pm$ 4,3 AB	0,2 $\pm$ 0,2
	S2	0,2 $\pm$ 0,1	23,9 $\pm$ 2,2	13,2 $\pm$ 1,3 A	30,7 $\pm$ 1,9 B	35,8 $\pm$ 5,8 A	0,3 $\pm$ 0,2
	S3	1,4 $\pm$ 1,4	22,4 $\pm$ 2,5	11,7 $\pm$ 0,8 AB	21,9 $\pm$ 1,7 A	44,0 $\pm$ 3,8 AB	0,0 $\pm$ 0,0
	S4	0,1 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 1,1	9,0 $\pm$ 0,7 B	16,5 $\pm$ 0,4 A	55,5 $\pm$ 1,0 B	0,0 $\pm$ 0,0
	S5	0,4 $\pm$ 0,1	21,3 $\pm$ 1,5	9,1 $\pm$ 0,5 AB	16,5 $\pm$ 1,6 A	54,6 $\pm$ 2,4 B	8,9 $\pm$ 8,8
	p	0,5619	0,4317	0,0233	<0,0001	0,0051	0,4328
NaOH 1M	S1	0,4 $\pm$ 0,3	11,9 $\pm$ 1,1	7,1 $\pm$ 0,5 A	64,3 $\pm$ 2,3 A	16,4 $\pm$ 2,8 A	0,9 $\pm$ 0,8
	S2	0,0 $\pm$ 0,0	10,3 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,3 AB	49,1 $\pm$ 0,9 B	34,9 $\pm$ 0,9 B	0,0 $\pm$ 0,0
	S3	0,3 $\pm$ 0,3	12,4 $\pm$ 0,7	6,1 $\pm$ 0,7 AB	36,7 $\pm$ 2,0 C	44,9 $\pm$ 1,7 C	0,0 $\pm$ 0,0
	S4	0,2 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 0,6 B	35,2 $\pm$ 1,0 C	49,6 $\pm$ 0,8 C	8,2 $\pm$ 8,2
	S5	0,0 $\pm$ 0,0	11,8 $\pm$ 1,2	5,1 $\pm$ 0,6 AB	33,2 $\pm$ 1,8 C	50,6 $\pm$ 1,7 C	0,0 $\pm$ 0,0
	p	0,5900	0,5630	0,0400	<0,0001	<0,0001	0,4569
NaOH 4M	S1	0,0 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 0,4 A	8,1 $\pm$ 0,4 A	64,3 $\pm$ 3,7 AB	18,2 $\pm$ 3,6 A	2,2 $\pm$ 0,4
	S2	0,1 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,5 AB	4,6 $\pm$ 0,3 B	69,6 $\pm$ 4,9 A	19,7 $\pm$ 5,1 A	0,9 $\pm$ 0,5
	S3	0,0 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 0,6 AB	3,6 $\pm$ 0,3 BC	64,7 $\pm$ 2,1 AB	25,2 $\pm$ 1,9 AB	1,6 $\pm$ 0,6
	S4	0,0 $\pm$ 0,0	4,1 $\pm$ 0,6 B	2,9 $\pm$ 0,5 C	60,3 $\pm$ 3,0 AB	31,3 $\pm$ 3,5 AB	1,3 $\pm$ 0,4
	S5	0,1 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,6 AB	3,7 $\pm$ 0,4 BC	52,4 $\pm$ 3,9 B	36,5 $\pm$ 3,1 B	0,8 $\pm$ 0,3
	p	0,5378	0,0069	<0,0001	0,0375	0,0080	0,2027
Resíduo	S1	0,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,1 A	0,8 $\pm$ 0,2 A	96,4 $\pm$ 1,3	2,0 $\pm$ 1,0	0,1 $\pm$ 0,1
	S2	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1 B	0,1 $\pm$ 0,1 B	98,2 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,2
	S3	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1 B	0,2 $\pm$ 0,1 B	98,5 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0
	S4	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1 AB	0,3 $\pm$ 0,1 AB	98,5 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0
	S5	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1 AB	0,3 $\pm$ 0,1 AB	96,9 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0
	p		0,0070	0,0056	0,3460	0,4689	0,5483

Análise do perfil de oligossacarídeos

Analizando os cromatogramas obtidos após a hidrólise com xiloglucano endoglucanase (XEG) (Figura 10), observa-se que as quantidades de XG em todas as frações são relativamente baixas. Nas frações clorito de sódio e oxalato de amônio praticamente não há XG. Os perfis das frações NaOH 0,1M e 1M são bastante semelhantes, apresentando um aumento na intensidade dos picos entre 5 e 10 minutos a partir do segmento 2, indicando um aumento no conteúdo de XG nos segmentos. Na fração NaOH 4M, os oligossacarídeos obtidos são diferentes daqueles das frações anteriores, onde os picos de maior intensidade aparecem entre 10 e 15 minutos e tendem a diminuir a partir do segmento 2. Desta forma, estes tipos de oligossacarídeos estão presentes em menor quantidade em segmentos com o aerênquima mais desenvolvido. Por terem um tempo de retenção maior, estes fragmentos são provavelmente maiores e/ou mais complexos, ou seja, com maior grau de ramificação. Os picos observados até aproximadamente 5 minutos são resultantes da degradação natural dos polissacarídeos, como visto no controle da reação (Anexo 2).

Os cromatogramas da digestão com xilanase (Figura 11) indicam que, na fração clorito de sódio e oxalato de amônio, a quantidade de xilanos é muito baixa, não apresentando picos característicos da digestão desse polissacarídeo. Os picos vistos nos cromatogramas são referentes à enzima (Anexo 3).

A maior parte dos xilanos é encontrada nas frações de NaOH. De maneira geral, os perfis das três concentrações de NaOH são parecidos, porém a intensidade dos picos é maior em 0,1M e 1M. Nas três frações, a quantidade de xiloses (identificadas por *a*) tem pouca variação, enquanto a xilobiose e xilotriose (*b* e *c*, respectivamente) tendem a aumentar em segmentos que possuem o aerênquima mais desenvolvido. As séries de oligossacarídeos arabinosilados (*d*) também têm esta tendência em 0,1M e 1M, porém em 4M só há aumento entre os segmentos 1 e 2 e a quantidade é mantida até o quinto segmento.

A digestão com a enzima liquenase gerou oligossacarídeos com três, quatro e cinco glicoses, indicados por *a*, *b* e *c*, respectivamente (Figura 12). Os

cromatogramas indicam uma grande quantidade de BG em todas as frações, principalmente em NaOH 1M. Nas frações clorito de sódio, NaOH 0,1M e 4M existe uma tendência da quantidade dos oligossacarídeos, principalmente trissacarídeos (a), aumentar do segmento 1 para o 2 e diminuir gradativamente até o segmento 5; em oxalato de amônio há uma leve tendência de diminuição do segmento 1 ao 5 e, em NaOH 1M, praticamente não há variação da quantidade de BG.

Figura 10: Perfil dos oligossacarídeos de xiloglucano das frações de parede celular dos segmentos de raiz (S1-S5) produzidos após digestão enzimática com XEG. Os oligossacarídeos produzidos por esta enzima ainda não foram identificados.

Figura 11: Perfil dos oligossacarídeos de arabinoxilanos das frações de parede celular dos segmentos de raiz (S1-S5) produzidos após digestão enzimática com xilanase; xilose **(a)**, xilobiose **(b)**, xilotriose **(c)**, oligossacarídeos arabinosilados **(d)**.

Figura 12: Perfil dos oligossacarídeos de β -glucano das frações de parede celular dos segmentos de raiz (S1-S5) produzidos após digestão enzimática com liquenase; trissacarídeo **(a)**, tetrassacarídeo **(b)**, pentassacarídeo **(c)**

Perfil glicômico: reações de anticorpos com epítomos da parede celular durante o desenvolvimento

A partir das reações realizadas entre as frações com os diferentes anticorpos foi possível obter o perfil demonstrado na Figura 13. De modo geral, observa-se que alguns grupos de anticorpos não apresentaram reação cruzada com as amostras, como por exemplo, os xilanos dos grupos 1 e 2, galactomanano do grupo 2 e manano acetilado. Os demais grupos de anticorpos apresentaram reação cruzada e os detalhes observados em cada um destes grupos são descritos a seguir.

Xiloglucanos

Dentro do grupo dos XGs não-fucosilados, observou-se que os grupos 1 e 2 apresentaram reação cruzada com todas as frações e o grupo 3 e o primeiro anticorpo do grupo 4 (CCRC-M58) tiveram resposta apenas nas frações de NaOH 1M e 4M. A maioria dos anticorpos destes grupos, principalmente 1 e 2, indicou uma diminuição na intensidade da marcação de XG não-fucosilados ao longo dos segmentos, nas frações oxalato de amônio, NaOH 0,1M e NaOH 4M, sendo as variações mais evidentes nas duas primeiras frações citadas. Na fração NaOH 1M, a presença do XG não-fucosilado é constante em todos os segmentos.

Apenas um anticorpo (CCRC-M84) mostrou resposta significativa no grupo dos XG fucosilados. Assim como nos XG não-fucosilados, este anticorpo indicou uma tendência de diminuição em segmentos com o aerênquima mais desenvolvido em todas as frações.

Xilanos

Os resultados acerca dos xilanos revelaram que os epítomos relacionados aos grupos 1, 2 e 3 (exceto pelo anticorpo CCRC-M114) não estão presentes nestas amostras de raízes de cana de açúcar. Os anticorpos pertencentes ao grupo 5 são detectáveis apenas nas frações de NaOH, enquanto os anticorpos dos grupos 4, 6 e 7 apresentaram reação cruzada com epítomos em todas as frações. Considerando os grupos de 4 a 7, observa-se que a quantidade de epítomos aumenta nas frações ao longo do processo de

fracionamento, porém há uma pequena redução na intensidade de marcação na fração NaOH 4M. Sendo assim, as frações NaOH 0,1M e 1M são as mais ricas em xilanos. Dentro destas frações, observa-se uma tendência discreta no aumento da resposta ao longo dos segmentos, com um pico de intensidade no segmento 4. Nas outras frações, os anticorpos de um mesmo grupo variam de forma diferente, não sendo possível observar uma tendência consistente.

β -glucano

O grupo dos anticorpos anti- β -glucano é composto por dois anticorpos - LAMP e BG1. O primeiro reage com glucanos com ligações β -1,3, enquanto o segundo reage com os glucanos de ligação mista (β -1,3 e β -1,4). Nos perfis das frações de paredes celulares de raízes de cana, apenas o segundo mostrou resposta, indicando a presença de β -glucano de cadeia mista em várias frações. Poucas variações na ligação com o anticorpo contra BG foram observadas entre os segmentos em todas as frações. Uma exceção é a fração clorito de sódio, onde foi possível observar um pico de reação cruzada no segmento 4.

Pectinas

Nos grupos de cadeia principal de HG 1 e 2 observa-se o aumento em reações cruzadas de todos os anticorpos deste grupo com este polissacarídeo ao longo dos segmentos na fração clorito de sódio, exceto pelo anticorpo JIM136. Nas outras frações, esta reação possui intensidade nula ou baixa intensidade e parece ser constante entre os segmentos.

A reação cruzada entre os anticorpos com especificidade para cadeia principal de ramnogalacturonano I (RG-I) foi baixa, destacando-se apenas o anticorpo CCRC-M14, o qual apresentou nível de ligação constante ao longo dos segmentos nas frações oxalato de amônio, NaOH 0,1M e 1M e, em menor proporção, na fração NaOH 4M. Na fração clorito de sódio foram detectadas reações cruzadas apenas nos segmentos 4 e 5.

No grupo de anticorpos específicos para RG-I de sementes de linhaça (Linseed mucilage RG-I), observou-se um pequeno aumento na intensidade de reações cruzadas com epítomos ao longo dos segmentos na fração Clorito de

Sódio, porém o mesmo não foi observado nas outras frações, as quais se mantiveram constantes.

O grupo RG-I/Arabinogalactano (AG) é o maior dos grupos e pode ser subdividido de acordo com a classificação sugerida em Pattathil e col. (2010), que se baseia na similaridade dos padrões de ligação dos anticorpos com diversos polissacarídeos de plantas. Os subgrupos apresentaram variações nas intensidades de ligações entre si, porém poucas variações foram observadas ao longo dos segmentos. De modo geral, apenas na fração clorito de sódio observa-se uma variação consistente ao longo dos segmentos, no sentido de aumento da quantidade de epítomos de RG-I/AG do segmento 1 para o segmento 5. Nas outras frações, somente o subgrupo formado pelos anticorpos CCRC-M12, CCRC-M7 e CCRC-M77 apresentam variação ao longo dos segmentos. Os outros subgrupos, que reconhecem galactanos e arabinanos, como o aquele formado por JIM131, CCRC-M22, JIM132 e JIM1, não apresentam variação entre os segmentos.

Poucos anticorpos dos grupos AG1, 2, 3 e 4 apresentaram reação com epítomos das paredes celulares de cana, destacando-se apenas um ou dois por grupo. Na fração clorito de sódio observa-se aumento na intensidade de ligação em segmentos com maior porcentagem de aerênquima. Nas demais frações, houve um menor número de anticorpos ligados que apresentaram padrão constante entre os segmentos.

Figura 13: Perfil glicômico das frações de parede celular separados por segmentos (números). Abaixo a palheta de cores em relação à absorbância, variando de baixa absorbância (preto) a alta absorbância (amarelo). À direita localizam-se os números dos anticorpos e o grupo a qual pertencem. **Non-fuc XG**: xiloglucano não fucosilado; **Fuc XG**: xiloglucano fucosilado; **Acetylated mannan**: manano acetilado; **HG Backbone**: cadeia principal de homogalacturonano; **RG-I Backbone**: cadeia principal de ramnogalacturonano-I; **Linseed mucilage RG-I**: ramnogalacturonano de mucilagem de linhaça; **RG-I**: ramnogalacturonano-I; **AG**: arabinogalactano.

Imunolocalização de polissacarídeos

Os anticorpos para a etapa de imunolocalização foram escolhidos com base nos resultados do perfil glicômico. Esta seleção se iniciou com a exclusão daqueles que não tiveram reação com os polissacarídeos obtidos no fracionamento. Este processo levou a um total de 95 anticorpos que tiveram ligação com pelo menos uma das frações e, com isso, foram excluídos nove dos 31 grupos de polissacarídeos. Dentre os anticorpos que apresentaram reação cruzada com polímeros da parede de cana, os padrões de ligação (crescente, decrescente ou uniforme) foram analisados e comparados dentro dos grupos; quando mais de um padrão de variação foi observado dentro do grupo, como no caso do XG não-fucosilado-2, cada um dos padrões foi testado. A escolha dos anticorpos dentro do grupo e de cada padrão foi feita considerando a intensidade da resposta, a existência de publicação prévia do anticorpo e a especificidade de sua reação cruzada com outros polissacarídeos, de acordo com o banco de dados WallMabDB. Após esta seleção, chegou-se a um conjunto de 35 anticorpos a serem testados utilizando imunolocalização.

Xiloglucanos

Para os grupos de XG não-fucosilados foram utilizados quatro anticorpos – CCRC-M95, CCRC-M87, CCRC-M100 e CCRC-M58, um para cada subgrupo que obteve resposta no perfil glicômico – grupos 1 a 4, respectivamente. Embora o anticorpo CCRC-M58 tenha apresentado ligação nas frações NaOH 1M e 4M no perfil glicômico, este mesmo anticorpo não apresentou ligação cruzada na imunolocalização. As respostas dos outros três anticorpos utilizados tiveram padrão similar nos diferentes segmentos de raiz, porém em intensidade diferente, sendo a maior intensidade observada na reação com o anticorpo CCRC-M95, usado como exemplo para demonstrar a variação entre os segmentos (Figura 14). Estes anticorpos apresentaram reação cruzada com XG nas paredes dos vasos do metaxilema, com células aparentemente em divisão no córtex em todos os segmentos e com as paredes de células da epiderme. A intensidade da ligação aumentou gradativamente com o desenvolvimento da raiz (Figura 14).

Figura 14: Imunolocalização de xiloglucano não-fucosilado, representado pelo anticorpo CCRC-M95 do grupo 1. Segmentos 1 (**D**) 3 (**E**) e 5 (**F**) mostram marcação nos vasos do metaxilema (mx) e epiderme (ep) em todos os segmentos. Células em divisão no córtex (setas) são observadas nos segmentos 1 e 3 (**D** e **E**). A intensidade da ligação em todas as paredes aumenta com o desenvolvimento da raiz (**D-F**), inclusive no córtex (co), que se torna mais visível no segmento 5 (**F**). Controles com coloração de Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com o anticorpo CCRC-M95 (**A-C**). Barra=100μm.

Para o grupo de XG fucosilado foi utilizado o anticorpo CCRC-M84, o qual mostrou ligação apenas na parede externa da epiderme em todos os segmentos, sem variação de intensidade entre os segmentos.

Xilanos

Os anticorpos dos grupos 3 (CCRC-M114) e 5 (CCRC-M144 e CCRC-M155) não mostraram ligação na imunolocalização, apesar destes últimos terem apresentado reação relativamente alta no perfil glicômico.

O anticorpo CCRC-M154, do grupo 4, mostrou ligação em todas as paredes e em igual intensidade em todos os segmentos, inclusive nas lamelas de paredes que separam os espaços do aerênquima (Figura 15, D-F). Observam-se também pontos “falhados” na ligação entre paredes de células do córtex em todos os segmentos, notadamente nas paredes periclinais. O epítipo para este anticorpo não é conhecido, porém tem forte ligação a extratos de sorgo, milho e AX de trigo.

No grupo 6, os três anticorpos testados (CCRC-M153, CCRC-M139 e CCRC-M138) tiveram respostas semelhantes, diferindo apenas em

intensidade. Neste caso, os cortes realizados com o anticorpo CCRC-M138 foram utilizados como exemplo das variações observadas. Houve localização da exoderme e cilindro esclerenquimatoso, mas não da epiderme (Figura 15, J-L). No córtex, é possível observar apenas alguns pontos de ligação muito fracos, quando comparados com a exoderme, por exemplo, nas paredes em geral e nas junções triangulares. Houve ligação também na endoderme, floema e medula parenquimática, mas não no metaxilema. Observa-se que a intensidade da ligação aumenta do segmento 1 em direção ao segmento 5, sendo mais evidente entre os segmentos 1 e 3 (Figura 15 G-L). A estrutura do epítipo para estes anticorpos também é desconhecida, porém, sabe-se que é diferente daquela do grupo 4 através do estudo de reações cruzadas mostrado na WallMabDB.

No grupo 7, foram utilizados 2 anticorpos, os quais tiveram respostas diferentes entre si (Figura 16). O anticorpo CCRC-M160 apresentou um padrão de ligação semelhante àquele do grupo 6, com ligação mais evidente na exoderme, cilindro esclerenquimatoso, endoderme, floema e parênquima xilemático, as quais aumentam em direção ao segmento 5. Por outro lado, o padrão do anticorpo CCRC-M149 assemelha-se ao grupo 4 e 6 combinados, ou seja, há ligação em todas as paredes, porém sem variação entre os segmentos.

Figura 15: Imunolocalização de xilanos do grupo 4 (CCRC-M154) e grupo 6 (representado pelo anticorpo CCRC-M138). O anticorpo do grupo xilano-4 marcou todas as paredes, sem mudanças ao longo do desenvolvimento da raiz (segmentos 1, 3 e 5 – **D, E e F**). Controles com coloração de Azul Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com anticorpo CCRC-M154 (**A-C**). O anticorpo do grupo xilano-6, representado por CCRC-M138, mostrou reação cruzada com tecidos periféricos (pe) da exoderme e cilindro esclerenquimatoso e alguns pontos mais fracos nas paredes do córtex (co) em geral e nas junções triangulares, um pouco mais destacadas. No cilindro vascular, ligação na endoderme (en), floema (fl) e medula parenquimática (mp), mas não no metaxilema. A intensidade da ligação aumenta em todos os tecidos mencionados com o desenvolvimento da raiz, visivelmente entre os segmentos 1 (**J**) e 3 (**K**) e a ligação no córtex se torna mais visível no segmento 5 (**L**). Controles com coloração de Azul de Toluidina dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com anticorpo CCRC-M138 (**G-I**). Barra=100μm.

Figura 16: Imunolocalização de xilanos do grupo 7 – CCRC-M160 (D-F) e CCRC-M149 (J-L). O anticorpo representado acima evidenciou principalmente os tecidos periféricos (pe – epiderme, exoderme e cilindro esclerenquimatoso), endoderme (en), floema (fl) e parênquima xilemático (px), mas não o metaxilema. A intensidade da ligação aumenta do segmento 1 (D) para o segmento 3 (E) e mantém-se igual no segmento 5 (F). Controles com coloração Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com o anticorpo CCRC-M160 (A-C). O anticorpo CCRC-M149 teve marcação em todas as paredes da secção, porém com intensidade ainda mais forte nos tecidos periféricos (pe) e medula parenquimática (mp) e menor intensidade no córtex (co). Controles com coloração Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com o anticorpo CCRC-M149 (J-L).

β -glucano

No segmento 1, o anticorpo para β -glucano (BG1) se liga a todas as paredes da secção, com poucas variações de intensidade, como nas paredes anticlinais da endoderme (Figura 17). Assim como em alguns anticorpos para xilanos, é possível observar falhas de ligação entre células em maiores aumentos, majoritariamente nas paredes periclinais (Figura 17 G). A partir do

segmento 2 é possível notar que a ligação do anticorpo diminui em algumas regiões do córtex mais próximas da epiderme. Em aumentos maiores, é possível evidenciar a diferença da ligação do anticorpo entre estas células e aquelas ainda intactas (Figura 17 H). Nos segmentos seguintes, observa-se o aumento da área sem reação cruzada do anticorpo no córtex, que agora se estende até a endoderme. Porém, a ligação na epiderme, cilindro esclerenquimatoso e cilindro vascular se mantém inalterada. No segmento 5, a maior parte do córtex não possui ligação do anticorpo.

Figura 17: Imunolocalização de β -glucano utilizando o anticorpo BG1. No segmento 1 (D) há marcação de todas as paredes uniformemente. No segmento 3 (E) é possível observar redução de ligação em algumas regiões do córtex (co), enquanto os tecidos periféricos (pe), endoderme (en) e cilindro vascular (cv) mantêm a ligação. No segmento 5 (F), a ligação deste anticorpo desaparece do córtex, porém se mantém praticamente intacta nos outros tecidos. Controles com coloração de Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com anticorpo BG1 (A-C). Falhas são observadas principalmente nas paredes periclinais (setas) desde o segmento 1 (G). Detalhe da diferença entre as paredes com β -glucano degradado (à esquerda) e ainda não degradado, mais próximo ao cilindro vascular (à direita) no segmento 4 (H). Barra=100 μ m.

Pectinas

As respostas dos três anticorpos (CCRC-M38, CCRC-M131 e JIM7) usados para testar os dois grupos de cadeia principal de HG foram semelhantes, exceto pelas intensidades de fluorescência, apesar dos epítomos reconhecidos serem diferentes. Enquanto CCRC-M38 e CCRC-M131 (grupo 1) reconhecem HG desesterificados, JIM7 (grupo 2) reconhece HG parcialmente metil-esterificado. Estes anticorpos se ligaram, principalmente, às junções triangulares e apresentam ligação pontual nas lamelas que persistem após a formação do aerênquima (Figura 18). Há ligação sutil nas outras paredes do córtex, que diminui ou se torna descontínua ao longo dos segmentos. A ligação com as junções triangulares também parece diminuir ao longo dos segmentos. No caso dos dois grupos de anticorpos, mas principalmente dos anticorpos que reagem com HG desesterificados, a marcação no segmento 1 é somente nas junções entre as células e passa a marcar toda a parede nos segmentos 3 e 5. O mesmo ocorreu com JIM7, mas não de forma tão evidente, ou seja, somente no segmento 5 e em volta do aerênquima já formado.

Figura 18: Imunolocalização de cadeia principal de HG, representada pelo anticorpo CCRC-M38 (D-F) e JIM7 (J-L). Ligação do anticorpo às junções triangulares no segmento 1 e em poucas outras paredes, como evidenciado no segmento 3 (E). No segmento 5 (F e L) algumas marcações pontuais ainda são observadas mesmo nas lamelas de parede celular (la) que dividem os espaços de gás do aerênquima. A marcação das junções triangulares também aparenta diminuição de intensidade com o desenvolvimento da raiz. Controles com coloração de Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com anticorpo CCRC-M38 (A-C) e JIM7 (G-I). Barra=100µm.

Para a cadeia principal de RG-I foram utilizados dois anticorpos (CCRC-M14 e CCRC-M35), porém apenas o primeiro mostrou uma fraca ligação nas células em divisão do córtex (resultados não mostrados), o que poderia ser esperado devido à baixa resposta de ambos os anticorpos no perfil glicômico.

Para a localização do Linseed Mucilage RG-I foi utilizado o anticorpo CCRC-M164. A sua ligação é mais forte no floema e na parede periclinal exterior da epiderme. Uma ligação mais fraca pode ser observada em maior

aumento em todas as células do córtex, que permanece constante ao longo dos segmentos, inclusive nas lamelas (Figura 19).

Figura 19: Imunolocalização de RG-I de mucilagem de linhaça (Linseed Mucilage) utilizando o anticorpo CCRC-M164 no segmento 5, usado como exemplo. **(B)** Ligações indicam presença deste polissacarídeo na parede periclinal exterior da epiderme (ep) e floema (fl). Uma fraca ligação pode ser observada nas paredes do córtex (co) e nas lamelas (la') que separam os espaços do aerênquima. Este mesmo padrão é observado em todos os segmentos. **(A)** Controle com coloração de Azul de Toluidina da mesma região usada na imunolocalização. Barra=100μm.

Foi utilizado o anticorpo JIM137 para o grupo RG-Ib e este mostrou reação cruzada somente nas junções triangulares, as quais permanecem nas lamelas, similar ao padrão de ligação dos anticorpos para cadeia principal de HG, como observado na Figura 18.

Para o grupo RG-Ic foi utilizado o anticorpo CCRC-M23, mas não foi detectada reação cruzada.

Como o grupo dos RG-I/AG é composto por muitos anticorpos que tiveram padrões diferentes no perfil glicômico, este foi dividido em quatro subgrupos, de acordo com a classificação de Pattathil e col. (2010), para a imunolocalização. Entretanto, o padrão de respostas dos anticorpos dos diferentes subgrupos testados (CCRC-M80, CCRC-M13, CCRC-M7, CCRC-M121, CCRC-M22 e CCRC-M8) foi similar, variando apenas a intensidade da fluorescência, exceto pelo anticorpo CCRC-M8, para o qual não foi obtida resposta. Os epítomos reconhecidos por estes anticorpos não são conhecidos, porém todos interagem com uma variada gama de RG-I de diversas origens. A ligação destes anticorpos apresentou reação cruzada em todas as paredes, permanecendo constante ao longo dos segmentos (Figura 20). Entretanto, a intensidade da fluorescência é reduzida nas lamelas que separam os espaços

do aerênquima, como nas paredes ao redor destes espaços (Figura 20 I). Além disso, no segmento 1, há ligação com material citoplasmático, adjacente à parede periclinal mais próxima ao cilindro vascular (Figura 20 G). Este padrão foi similar ao observado para os anticorpos CCRC-M154 e CCRC-M149 dos grupos dos Xilanos-4 e 7, respectivamente (Figuras 15 e 16). No segmento 2 (Figura 20 H), ainda foi possível observar o padrão pontilhado, agora, porém, distribuído por todo o citoplasma e em células alternadas. Do segmento 3 em diante, este padrão desaparece.

Figura 20: Imunolocalização de pectinas RG-I/AG, representada pelo anticorpo CCRC-M80. Marcação de todas as paredes da secção nos segmentos 1, 3 e 5 (**D-F**). Tecidos periféricos (pe), córtex (co), cilindro vascular (cv), lamela entre espaços do aerênquima (la). Detalhe em F ampliado em I. Controles com coloração de Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com anticorpo CCRC-M80 (**A-C**). Ligação do anticorpo em conteúdo citoplasmático no segmento 1 (**G**), principalmente próximo às paredes periclinais voltadas ao cilindro vascular (setas), e em padrão mais difuso no segmento 3 (**H**). A marcação nas paredes ao redor dos espaços gasosos e nas lamelas é reduzida, notadamente no segmento 5 (**I**). Barra=100µm.

As respostas do grupo dos arabinogalactanos foram de fraca intensidade, apesar de alguns anticorpos terem ligação intensa no perfil glicômico, notadamente o anticorpo JIM17, do grupo AG-3, que não teve

ligação nenhuma na imunolocalização. Além deste, MAC204 também não teve ligação, porém aparece com resposta menos intensa no perfil glicômico.

O grupo AG-2, testado com 3 anticorpos, apresentou respostas distintas. De acordo com a base de dados *Plant Cell Wall Monoclonal Antibody*, o anticorpo JIM14 se liga a glicoproteínas (AGP). As AGP estão localizadas no citoplasma, principalmente nos segmentos 1 e 2, e adjacentes às paredes em todos os segmentos; a ligação diminui fortemente em paredes que circundam os espaços de ar do aerênquima (Figura 21 D). a marcação do anticorpo JIM19 aparece em padrão pontilhado, principalmente no citoplasma das células do cilindro vascular e do cilindro esclerenquimatoso (Figura 21 E); a intensidade diminui ao longo dos segmentos, mas ainda está presente no segmento 5 de forma mais fraca. O anticorpo CCRC-M107 marca fracamente paredes de células na transição entre o córtex e o cilindro vascular (Figura 21 F).

O anticorpo JIM13, que também é considerado um marcador de AGP, se liga a estruturas no citoplasma nos segmentos 1 e 2 de forma semelhante aos anticorpos de RG-I e à parede de maneira uniforme no córtex (Figura 21 J-L). Em segmentos mais distantes do ápice, ainda é possível observar pontos de ligação próximos às paredes, assim como JIM14; a ligação nas paredes desaparece naquelas adjacentes ao aerênquima (Figura 21 L, asteriscos) e aumenta nas paredes do cilindro vascular.

Figura 21: Imunolocalização de AG com anticorpos do grupo AG-2 (**D-F**) e AG-4 (**J-L**). Ligação do anticorpo JIM14 a material citoplasmático (seta) e parede celular, mas em menor quantidade nas lamelas de parede que circundam o aerênquima no segmento 5 (**D**, asteriscos). Padrão pontilhado de ligação do anticorpo JIM19 a conteúdos citoplasmáticos de células do cilindro esclerenquimatoso (ce) e do cilindro vascular (cv) no segmento 1 (**E**). Ligação fraca do anticorpo CCRC-M107 a paredes de células na transição entre o córtex (co) e cilindro vascular (cv) no segmento 1 (**F**). Controles com coloração de Azul de Toluidina da mesma região mostrada (**A-C**). Marcação do anticorpo JIM13 a estruturas no citoplasma de células corticais (co) e epiderme (ep) no segmento 1 (**J**), mas não em células do cilindro vascular (cv). A marcação nas paredes do cilindro vascular aumenta nos segmentos 3 (**K**) e 5 (**L**) enquanto a do conteúdo citoplasmático e das paredes que circundam o aerênquima diminui (asteriscos em **L**). Controles com coloração de Azul de Toluidina da mesma região dos segmentos 1, 3 e 5 marcada com o anticorpo JIM13 (**G-I**). Barra=100µm.

Epítomos não aparentes em imunofluorescência e presentes no perfil glicômico

Alguns resultados de imunolocalização não foram consistentes com o esperado, pois não apresentaram ligação, apesar da alta absorbância no perfil

glicômico. Uma possível explicação é que os polissacarídeos teriam sido modificados durante a o fracionamento da parede celular, possivelmente por perda de radicais acetila e metila, criando assim epítomos que não estão presentes no material original. Com isto, tais epítomos apresentariam reação cruzada no perfil glicômico, mas não em imunofluorescência. Para testar esta hipótese, secções do segmento 3 foram tratadas com NaOH 1M e, em seguida, o procedimento de imunolocalização foi realizado novamente. Estes ensaios foram realizados com os seguintes anticorpos: CCRC-M144 e CCRC-M155 do grupo Xilano 5, CCRC-M8 do RG-I/AG e JIM17 do grupo AG 3. Outros anticorpos que também não apresentaram ligação na imunolocalização não foram testados, pois não apresentaram ligação tão forte no perfil glicômico quanto à observada para os quatro anticorpos mencionados acima.

Após o tratamento com hidróxido de sódio, os anticorpos para xilanos passaram a apresentar reação cruzada com grande parte das paredes celulares do segmento 3 (Figura 22 A-B). No entanto, os anticorpos relacionados às pectinas, mostraram ligação apenas nas células da epiderme (Figura 22 C-D).

Figura 22: Imunolocalização após tratamento da secção com NaOH 1M utilizando anticorpos que não tiveram marcação no ensaio regular. Anticorpo CCRC-M144 e CCRC-M155 contra xilanos (**A e B**) mostraram ligação em todas as paredes celulares. Anticorpos CCRC-M8 e JIM17 contra RG-I e AG, respectivamente, ligaram-se apenas à epiderme (ep) após o tratamento (**C e D**). Barra=100µm.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e imunolocalização com ouro coloidal

A preparação do material para MET não permitiu a identificação de membranas. Apesar disso, foi possível observar algumas evidências da MCP, além de outras características celulares e algumas mudanças na parede celular. No segmento 1 (Figura 23 A-C), todas as células observadas tinham citoplasma distinguível, sendo este translúcido com algumas partículas elétrondensas, e notou-se a presença de muitas organelas, como complexos de Golgi e mitocôndrias. Estas características indicam que as células estão vivas e ainda não têm indícios observáveis de MCP. Na Figura 23 A, a lamela média da junção triangular está bastante proeminente, mas com menor espessura e maior espaço intercelular, em C.

No segmento 2 (Figura 23 D-F) observa-se um maior espaço intercelular na junção triangular, inclusive com clara degradação da lamela média nos vértices destas junções. O citoplasma parece mais elétron-denso que no segmento 1 e tem forte coloração em algumas células.

O citoplasma se torna mais elétron-denso e este parece apresentar menor espessura no segmento 3 (Figura 23 G-I). Na Figura 23 G, pode ser observada completa separação de paredes celulares (seta) e, em I, a formação de vesículas ou espaços de densidade diferente daquela do citoplasma (asterisco).

No segmento 4 ainda é possível notar a separação de células e citoplasma de densidade muito mais alta que aquela no segmento 1, além de modificações nas paredes da lamela entre os espaços do aerênquima, mostrando dobramentos (Figura 23 J-L). As paredes também começam a ter um aspecto lamelar, o que fica mais evidente no segmento 5 (Figura 23 M). No segmento 5, todos os estágios da MCP podem ser observados no córtex, além da presença de células vivas com atividade aparentemente normal, ao lado de células já mortas, mas com paredes íntegras (Figura 23 M-O). Há dobramento de mais paredes e em maior grau, onde diversas camadas de paredes parecem empilhadas em volta dos espaços do aerênquima e ao lado de células vivas (Figura 23 O).

Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão dos segmentos. Segmento 1: junção triangular mostrando lamela média espessa e pequeno espaço entre as três paredes (A); paredes entre duas células ativas com plasmodesma e organelas (B); junção triangular com maior espaço entre as células (C). Segmento 2: junção triangular com grande espaço entre as células (D); lamela média em degradação no vértice da junção triangular com diversas organelas em ambas as células (E); junção entre células em estágios distintos, com densidade do citoplasma diferente em MET (F). Segmento 3: separação completa de células ainda vivas pela degradação da lamela média (seta) (G); citoplasma elétron-denso e presença de núcleo condensado (H); junção entre uma célula sem citoplasma e duas com citoplasma, sendo uma delas com presença de vesículas de baixa densidade em MET (I). Segmento 4: término da separação entre duas paredes, sendo uma já morta, com conteúdo elétron-denso, e outra em MCP, com citoplasma bastante elétron-denso (J); junção entre uma célula com grande quantidade de conteúdo citoplasmático de alta densidade e outra (acima) com uma fina camada de citoplasma e espaço intercelular à direita (K); paredes com dobramentos da lamela do aerênquima (L). Segmento 5: degradação da lamela média entre duas células vivas e evidência de padrão lamelar das paredes (M); vértice de junção triangular entre uma

(continuação da legenda da Figura 23) célula viva e outra sem citoplasma (**N**); paredes colapsadas na região em volta do aerênquima ao lado de uma célula viva (**O**). (pc) parede celular, (lm) lamela média, (pl) plasmodesma, (jt) junção triangular, (ci) citoplasma, (nu) núcleo, (ve) vesícula. Barras=0,5µm (**B, M, O**), 1µm (**A, E, F, I, J, N, L**), 2µm (**C, D, H, K**), 5µm (**G**).

A imunolocalização de polissacarídeos com ouro coloidal associa os anticorpos já utilizados na microscopia de fluorescência com ouro coloidal conjugado ao anticorpo secundário para que possa ser observado em MET, possibilitando observar os locais específicos onde os polissacarídeos são encontrados. Esta técnica foi realizada apenas nos segmentos 4 e 5, onde era esperado que as modificações na parede celular já tivessem ocorrido. Foram utilizados anticorpos para os quatro principais grupos – β -glucano (BG1), xilanos (CCRC-M154), HG (CCRC-M38) e RG-I (CCRC-M7). Todos os anticorpos apresentaram resultados semelhantes em ambos os segmentos (Figura 24). Não foram encontradas evidências da ligação do anticorpo CCRC-M7 em nenhum dos dois segmentos.

De forma geral, apenas os xilanos foram identificados amplamente em todas as paredes, incluindo as lamelas entre os espaços de gás e em locais onde houve forte sinal de degradação da parede celular (Figura 24 A-B). O polissacarídeo BG foi localizado na porção interna das paredes ainda vivas, adjacentes ao citoplasma, na região menos elétron-densa. Além disso, ele foi observado em células vivas próximas a conjuntos de paredes colapsadas, indicando que a degradação deste polissacarídeo é bastante delimitada (Figura 24 C). No restante das células, ele foi encontrado apenas como poucos resquícios.

A ocorrência da localização de HG foi rara. Este polissacarídeo foi encontrado próximo à junção triangular entre duas células, restrito a um espaço delimitado por uma fina parede, mas de características similares àsquelas dos espaços intercelulares (Figura 24 D). Ele também foi observado, em menor concentração, na porção mais interna das paredes destas células.

Figura 24: Imunolocalização com ouro coloidal em microscopia eletrônica de transmissão. Localização de xilanos com o anticorpo CCRC-M154 por todas as paredes colapsadas e em menor quantidade no conteúdo intercelular **(A)** e em parede em maior grau de degradação **(B)**. Identificação de β -glucano com o anticorpo BG1 na porção interna da parede celular de uma célula viva, adjacente a paredes colapsadas **(C)**. Evidência de homogalacturonanos na parede de células vivas e em conteúdo intercelular na região da junção triangular **(D)**. Partículas de ouro foram aumentadas e realçadas em vermelho para melhor visualização. (pc) parede celular, (ci) citoplasma, (lm) lamela média, (jt) junção triangular. Barra=10 μ m.

7. Discussão

O processo de formação do aerênquima é bastante estudado do ponto de vista ecológico, para a compreensão de como esta estrutura auxilia na adaptação a ambientes variados. O enfoque destes estudos está nos fatores que induzem ou retardam este fenômeno e levam à morte celular programada. As mudanças na composição da parede celular durante a formação do aerênquima, por sua vez, pouco foram investigadas. Um dos poucos exemplos que integram mudanças na parede celular e formação do aerênquima é o estudo de Gunawardena e col. (2001b) que descreve o padrão de ligação de anticorpos para pectina (JIM5 e JIM7) em milho.

No presente estudo, a parede celular da raiz de cana-de-açúcar foi analisada durante a formação do aerênquima através de diversas metodologias. Através destas, foi possível perceber alterações na sua composição, mudanças nas características dos polissacarídeos e prováveis modificações das propriedades físicas, ainda não descritas para raízes de espécies que formam aerênquima. Mais do que a “degradação da parede celular”, como é tratado em definições de aerênquima lisígeno (Evans, 2003; Smirnoff & Crawford, 2003), pudemos observar que este fenômeno é resultado de uma sequência de eventos que permitem modificações da parede celular, e não necessariamente a sua completa degradação, resultando na abertura dos espaços gasosos.

Formação do aerênquima em cana-de-açúcar

Os resultados obtidos por meio da microscopia de luz demonstram que a formação do aerênquima no córtex da raiz de cana-de-açúcar tem início a partir do segundo segmento (entre 1 e 2 cm do ápice) e, no quinto segmento (entre 4 e 5 cm do ápice) já se encontra em sua forma mais desenvolvida, atingindo 40% da área do córtex (Figura 7). Resultados semelhantes foram observados por Gunawardena e col. (2001a) em raízes de plântulas de milho, onde em regiões com apenas 0,5 dia de vida, a formação do aerênquima já podia ser observada com tratamento de hipóxia (3% de oxigênio) e etileno ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$). Naquele trabalho, o desenvolvimento do aerênquima foi completado após 2,5

dias. Campbell e Drew (1983), também observaram em plântulas de milho o início de morte celular a 1 cm do ápice radicular e formação completa do aerênquima entre 3 e 4 cm, indicando ligeiras diferenças quando comparada com cana-de-açúcar.

A formação de espaços gasosos é limitada apenas ao córtex da raiz, permanecendo, em geral, três camadas de células periféricas - epiderme, exoderme e cilindro esclerenquimatoso, cujas paredes se tornam espessas e lignificadas com o desenvolvimento da raiz. Colmer (2003) discute que a presença desta camada de células de baixa permeabilidade funciona como uma “barreira à perda radial de O_2 ”, que reduz o escape de gases na sua difusão da parte aérea da planta para o ápice radicular. Em um trabalho com *Phragmites australis*, uma espécie resistente a alagamento com formação de aerênquima, Armstrong e col. (2000) observaram que a pressão parcial de O_2 no córtex aumenta em direção à base da raiz, enquanto o O_2 na superfície da raiz é maior no ápice e diminui em porções mais basais, indicando uma diminuição na perda radial de O_2 .

A formação do aerênquima pode ser influenciada por diferentes fatores ambientais, tais como oferta nutricional, água e temperatura (Drew *et al.*, 1989; Bouranis *et al.*, 2007), ou fatores artificiais, como, por exemplo, por meio da aplicação de etileno ou outros compostos químicos (Justin & Armstrong, 1991; Rajhi *et al.*, 2011). Desta maneira, a formação do aerênquima pode estar sujeita a variações dependendo da época de cultivo. No presente estudo, embora tenham sido observadas pequenas variações no padrão de desenvolvimento do aerênquima entre os lotes de plantas cultivadas, o aerênquima em raízes de cana-de-açúcar parece não ser exclusivamente dependente de fatores ambientais para sua formação. Experimentos em nosso laboratório ainda demonstraram que a formação de aerênquima em cana-de-açúcar ocorre independentemente das concentrações de nutrientes no cultivo da variedade SP80-3280. Além disso, ele está presente em diversas outras variedades comerciais (dados não mostrados), sempre cultivadas em condições aeradas. Desta forma, o desenvolvimento de aerênquima em cana pode ser considerado constitutivo, ou seja, ocorrer independentemente da indução de fatores externos. No entanto, esse processo pode ser acelerado se algum estresse nutricional, hídrico ou hipóxia estiver presente (Justin &

Armstrong, 1991; Kawai *et al.*, 1998). Assim como em cana, em arroz (Kawai *et al.*, 1998) e em outras plantas (por exemplo, plantas aquáticas), a formação de aerênquima em raiz ou outros órgãos pode ser constitutiva (Schussler & Longstreth, 2000).

Nos cultivares atuais de cana, a presença do aerênquima ainda pode estar associada ao local de origem dos parentais *Saccharum spontaneum* L. e *S. officinarum* L., que são espécies provenientes de regiões alagadas (Paul Moore, comunicação pessoal). Sabendo disto, é possível que o aerênquima nas variedades comerciais não seja fundamental para o estabelecimento da planta, já que as mesmas não são cultivadas sob alagamento ou déficit de nutrientes. Por outro lado, é possível que o gasto energético no meristema radicular seja muito alto, devido ao rápido desenvolvimento da planta, e o aerênquima, neste caso, permitiria o acúmulo de O₂ facilitando os processos respiratórios mesmo em condições aeradas. Para compreender a função do aerênquima em raízes de cana são necessários mais estudos sobre a sua fisiologia, assim como já foi realizado para outras gramíneas.

Caracterização da morte celular programada (MCP)

A formação do aerênquima também pode ser estudada por modificações em nível celular e subcelular observando-se eventos característicos à morte celular programada (MCP), que ocorrem antes da degradação da parede celular se tornar aparente. Alguns destes eventos estão descritos em milho (Gunawardena *et al.*, 2001a; Lenochová *et al.*, 2009) e arroz (Kawai *et al.*, 1998) e ocorrem em ordem diferente entre estes dois modelos, os mais estudados para este fenômeno. Na cana, a quebra de DNA, um dos primeiros sinais de MCP, foi observada a partir do segmento 2, onde ainda não é possível notar a formação de espaços gasosos (Figura 8). Independentemente do segmento, os núcleos TUNEL-positivos foram encontrados em todo o córtex, ao contrário da formação dos espaços do aerênquima, os quais são formados inicialmente na periferia e ampliados centripetamente pelo córtex (Figura 7). O mesmo padrão foi observado em milho, onde os núcleos com DNA fragmentado são observados uniformemente em todo o córtex, indicando

que a morte celular programada não ocorre centripetamente, como acontece com formação dos espaços do aerênquima (Gunawardena *et al.*, 2001a). Desta forma, é possível sugerir que as enzimas hidrolíticas que agem durante a formação dos espaços de gás devem ser sintetizadas ainda quando as células são jovens, no ápice da raiz (segmento 1), de maneira uniforme e armazenadas ou alocadas para a parede celular, onde atuam modificando-a, concomitantemente ao desenvolvimento da raiz.

A ação de enzimas hidrolíticas na parede celular para a formação do aerênquima pode ser considerada análoga àquela no amadurecimento de frutos e na mobilização de reservas de semente para a germinação. Em frutos de mamoeiro, Cavalari (2009) observou modificações na composição da parede celular durante o amadurecimento que proporcionaram mudanças nas suas propriedades físicas. Tonini (2004) sugeriu que as enzimas podem ser sintetizadas, modificadas e armazenadas no tegumento de *Sesbania virgata* e, durante a germinação, realocadas para o endosperma para a degradação da reserva, porém estas não devem agir de forma organizada, pois a degradação do endosperma é irregular.

Na raiz de cana-de-açúcar, as enzimas hidrolíticas de parede celular não devem agir simultaneamente e/ou com a mesma atividade devido ao padrão de formação dos espaços observados por meio da microscopia de luz. A ação das enzimas deve ocorrer mais intensa e rapidamente nas paredes de células periféricas e ter suas atividades gradativamente reduzidas no sentido do centro da raiz. Desta forma, a formação dos espaços pode decorrer da gradação no córtex de diversos fatores que devem influenciar na atividade destas enzimas, como temperatura, pH ou outros, que poderiam ser futuramente investigados.

Outros eventos da MCP em cana-de-açúcar foram observados em MET, tais como a formação de vesículas, citoplasma elétron-denso, condensação da cromatina e degradação da parede celular (Figura 23). Estes eventos, porém, não seguiram uma ordem definida, como descrita para milho (Campbell & Drew, 1983) e arroz (Kawai *et al.*, 1998). No caso da cana, a degradação da parede celular, que é a última etapa da MCP em milho (Gunawardena *et al.*, 2001a), pôde ser observada antes ou depois do citoplasma se tornar mais elétron-denso, por exemplo, com a desintegração da lamela média. Características observadas durante o presente estudo que não foram

encontradas em publicações anteriores contam com o caráter lamelar das paredes aumentando em direção ao segmento 5 e o dobramento da parede celular nas regiões ao redor do aerênquima e nas lamelas entre os espaços gasosos. Esta última particularidade sugere que a formação dos espaços gasosos do aerênquima não decorre somente da degradação da parede celular, mas também (ou principalmente) do seu dobramento e colapso.

Modificações bioquímicas e caracterização da parede celular

Os resultados obtidos com as análises bioquímicas da parede celular não podem ser diretamente relacionados somente à formação do aerênquima. Isto porque outros eventos ligados ao desenvolvimento da raiz, os quais incluem alterações na parede celular, podem estar ocorrendo concomitantemente. Neste contexto, devem ser levadas em consideração, por exemplo, alterações que se referem ao desenvolvimento do cilindro vascular, da epiderme, da exoderme e do cilindro esclerenquimatoso.

O rendimento do fracionamento da parede celular (Figura 9) indica que a parede celular do segmento 1, onde ainda não há a formação de aerênquima, é composta por uma quantidade maior de polissacarídeos mais solúveis, pois apresenta maior rendimento de extração nas primeiras frações e menor resíduo. Nos outros segmentos, os rendimentos das frações iniciais são reduzidos, enquanto o rendimento do resíduo aumenta.

A investigação da composição de polissacarídeos da parede celular de cada uma das frações e segmentos foi realizada por meio de diversas técnicas, que incluem o perfil glicômico (Figura 13), perfil de monossacarídeos (Tabela 2), perfil de oligossacarídeos (Figuras 10-12) e imunolocalização (Figuras 14-22). Desta forma, os resultados obtidos para cada um dos polissacarídeos analisados são discutidos abaixo separadamente para melhor compreensão das modificações ocorridas.

Nos resultados do perfil glicômico, observamos que, apesar do segmento 1 ter tido maior rendimento na fração clorito de sódio e as amostras terem sido aplicadas em igual quantidade de açúcar, o nível geral de intensidade de reações cruzadas com os anticorpos foi mais baixo, comparando com as outras frações. Uma possível explicação para este

fenômeno é que polissacarídeos com peso molecular de 20kDa ou menos não se aderem eficientemente às placas de ELISA (Pattathil *et al.*, 2012). Por ser a primeira fração, a extração com clorito de sódio extrairia polímeros com menor peso molecular. Desta forma, podemos inferir que grande parte da fração clorito de sódio em geral, mas principalmente os segmentos 1, 2 e 3, seja formada por polissacarídeos de menor peso molecular que não são detectados no ensaio do perfil glicômico. Podemos relacionar estes dados à ideia de que os primeiros segmentos são aqueles onde ocorre a maior taxa de síntese de polissacarídeos e estes poderiam ser sintetizados em fragmentos menores e, posteriormente, serem interligados na parede celular para formar polissacarídeos maiores (hipótese em teste).

Xiloglucanos

O perfil glicômico das diferentes frações demonstra que as paredes celulares de raiz de cana possuem xiloglucanos com baixo grau de fucosilação (Figura 13). Dentre estes, parece haver duas classes: 1) XG mais solúvel, que foi extraído nas frações de oxalato de amônio e NaOH 0,1M e que reduz sua abundância em direção ao segmento 5; 2) XG mais insolúvel, presente nas frações NaOH 1M e 4M, e que não apresentou alterações durante o desenvolvimento da raiz, pois a absorbância destes anticorpos se manteve constante. No entanto, os resultados da imunolocalização para este polissacarídeo (Figura 14) indicaram um aumento na intensidade da ligação dos anticorpos de XG ao longo do desenvolvimento da raiz. A discrepância entre estes dois resultados pode ter sido causada pela normalização do conteúdo de açúcares realizada, necessária para a confecção do perfil glicômico. Na tentativa de reduzir este efeito, foi criado um novo heatmap (Anexo 5) que considera, além do conteúdo de açúcares, o rendimento de cada uma das frações (indicado pelas barras na Figura 13). Com esta modificação foi possível observar que há melhor concordância dos dados, demonstrando que existe um aumento de XG em direção ao segmento 5 na fração NaOH 1M e um aumento na ligação do anticorpo CCRC-M95, também usado para imunolocalização. Como pode ser observado na Figura 14 F, o aumento da fluorescência devido à ligação com o anticorpo ocorre em toda a secção. Como

é pouco plausível que tenha ocorrido síntese e deposição deste polissacarídeo nas células do córtex já mortas, é presumível que tenha ocorrido a criação de novo epítopo por meio de modificações na estrutura do XG. Com esta modificação, alguma ramificação que antes estava bloqueada de alguma forma (devido à presença de outros polissacarídeos ou compostos fenólicos, por exemplo) passaria a ser reconhecida pelo anticorpo. Cavalari (2009) também observou mudanças no padrão de ramificação do XG durante o amadurecimento do fruto do mamão no momento de transição do tecido, de uma textura mais resistente para uma mais frouxa. No início do desenvolvimento, este polissacarídeo era pouco ramificado, aumentando a proporção de oligossacarídeos ramificados com Gal ao longo do amadurecimento e voltando a reduzir esta proporção no último estágio analisado. As ramificações do XG diminuem a sua interação intermolecular com o próprio e com a celulose, permitindo maior acesso de hidrolases, ao passo que a falta de ramificações tem papel inverso (Levy *et al.*, 1991; Vincken, 1996; Tiné *et al.*, 2003). Entretanto, o aumento de ligação do anticorpo observado no cilindro vascular da raiz de cana pode ter decorrido da síntese de XG nestas células, uma vez que esta estrutura mantém células vivas e apresenta visível espessamento de algumas paredes.

De acordo com a WallMabDB, os anticorpos CCRC-M95 e CCRC-M87, utilizados na imunolocalização, não se ligam a subunidades XXXG, ou seja, oligossacarídeos de XG com quatro glicoses, sendo três com ramificação de xilose (Tiné *et al.*, 2006). Porém, estes anticorpos se ligam a outros oligossacarídeos de XG. Por outro lado, o anticorpo CCRC-M100 se liga apenas a oligossacarídeos XXXG e não mostra reação cruzada com outras subunidades, apesar de Crivellari (2012) ter demonstrado, utilizando espectrometria de massas, a presença de fragmentos XXXG em paredes celulares de colmo de cana. O anticorpo CCRC-M58, o qual mostrou pouca reação no perfil glicômico e nenhuma na imunolocalização, tem como antígeno o oligossacarídeo XLLG, que é mais ramificado, sugerindo que este é pouco presente na composição do xiloglucano de raiz de cana-de-açúcar. Estes anticorpos sugerem que o XG seja pouco ramificado, com subunidades menores que XXXG, ou seja, com maior quantidade de Glc sem ramificação

com Xil, o que pode ser corroborado por Crivellari (2012), que detectou predominantemente oligossacarídeos do tipo XXGG e XXGGG.

Da mesma forma em que foi observado no perfil glicômico, o perfil de oligossacarídeos (Figura 10) demonstra que o XG encontrado nas frações NaOH 0,1M e 1M parecem ser menos ramificados, pois apresentam picos maiores em tempos de retenção mais baixos. A fração NaOH 4M mostra uma menor quantidade de XG, mas com maior grau de ramificação, definida pelos picos com maior tempo de retenção (10 minutos ou mais). Em relação aos segmentos, o perfil de oligossacarídeos também demonstra um aumento de XG ao longo dos segmentos na fração NaOH 0,1M e 1M e pouca variação na fração NaOH 4M, corroborando os resultados obtidos pelo perfil glicômico (Anexo 5).

Por razões diferentes, os resultados do perfil glicômico e dos perfis de oligossacarídeos sugerem a presença de dois tipos diferentes de XG: um mais solúvel e presente em maior quantidade nos segmentos mais próximos ao ápice e outro menos solúvel que permanece constante durante o desenvolvimento da raiz. Estes dois tipos teriam estruturas finas diferentes, assim como visto por Crivellari (2012). Este autor relatou a ocorrência de dois tipos de XG em colmo de cana-de-açúcar: um em maior quantidade, característico de monocotiledôneas, com subunidades menores, que teria tempo de retenção menor em HPLC; outro em menor quantidade, abundante em eudicotiledôneas e com subunidades maiores e mais ramificadas, com maior tempo de retenção. Crivellari (2012) encontrou os dois tipos de XG na mesma fração (NaOH 4M) em colmo, assim como de Souza e col. (2012). Porém, em folha, estes últimos autores encontram o XG característico de monocotiledôneas na fração NaOH 1M e uma mistura de ambos em NaOH 4M. Enquanto isto, em raiz, encontramos o XG de monocotiledôneas nas frações NaOH 0,1M e 1M e o característico de eudicotiledôneas na fração NaOH 4M.

Todavia, é válido ressaltar que a quantidade de XG em todos os órgãos de cana-de-açúcar é relativamente baixa, quando comparamos com β -glucano e xilanos (Silva, 2005; de Souza *et al.*, 2012). Os resultados indicam que não ocorre degradação do XG no córtex durante a formação do aerênquima. No entanto, observa-se um aumento proporcional de seus oligossacarídeos e a provável criação ou exposição de epítomos dos anticorpos específicos para XG.

Assim, acredita-se que este polissacarídeo necessite de modificações em sua estrutura para que seja possível a abertura de espaços gasosos.

Xilanos

No perfil glicômico, um pequeno aumento nos xilanos dos segmentos é observado nas frações NaOH 0,1M e 1M, com pico no segmento 4, principalmente nos anticorpos do grupo 5 e alguns do grupo 6 (Figura 13). Para este último grupo, os resultados corroboram a imunolocalização, porém não podem ser relacionados com a formação do aerênquima, já que o aumento da intensidade da fluorescência e da quantidade de células marcadas ocorre apenas no cilindro vascular e tecidos periféricos. A marcação do anticorpo somente nestes tecidos indica que existem xilanos com características diferentes no córtex e cilindro vascular. É conhecido que diferenças na estrutura do xilano podem influenciar o modo de ação das enzimas: a redução de substituições com arabinose e ácido glucurônico conferem alterações nas propriedades da biomassa, aumentando a liberação de açúcares em extração de parede celular, além de requerer menor quantidade de enzimas para sua completa hidrólise (Mortimer *et al.*, 2010). Desta forma, uma hipótese é que os xilanos reconhecidos pelos anticorpos do grupo 6 “travam” a parede celular, evitando a sua degradação e/ou modificação cilindro vascular, enquanto a sua ausência torna a parede mais suscetível ao ataque de hidrolases ou confere propriedades físicas diferentes, permitindo a formação do aerênquima no córtex. A caracterização da estrutura dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos deste grupo, ainda não descrita, pode auxiliar na corroboração desta hipótese.

Além das diferenças entre os xilanos do córtex e do cilindro vascular sugeridas pelos resultados obtidos com a imunolocalização dos anticorpos do grupo 6, os xilanos do córtex e dos outros tecidos parecem apresentar ramificações acetiladas. Isso é evidenciado pelos resultados da imunolocalização com os anticorpos do grupo 5. O tratamento do corte com NaOH antes do ensaio para imunolocalização resultou na ligação dos anticorpos desse grupo com epítomos (Figura 22), que antes do NaOH não era possível. O NaOH é conhecido por remover as acetilações (Selig *et al.*, 2009),

o que explica também porque o grupo 5 apresentou ligação com as frações após o tratamento com NaOH no perfil glicômico.

No perfil de monossacarídeos (Tabela 2), nota-se o aumento da proporção de Xil com o desenvolvimento da raiz em todas as frações, indicando um aumento de xilanos. Assim como visto no perfil glicômico, a maior quantidade de xilanos está presente na fração NaOH 1M. Se considerarmos que toda a Ara presente nas frações está ligada aos xilanos, o grau de ramificação diminui das frações mais solúveis para as menos solúveis. Em média, a proporção que está por volta de 1:2 (Ara:Xil) na fração clorito de sódio, diminui para 1:5 em NaOH 4M. O mesmo é observado no perfil de oligossacarídeos, onde as quantidades de fragmentos arabinosilados são similares nas frações NaOH 0,1M e 1M, mas diminuem na fração NaOH 4M (Figura 11). Isto indica que o arabinoxilano mais ramificado é liberado em frações mais solúveis, enquanto aquele menos ramificado só é liberado na fração 4M (menos solúvel) e, por isto, está mais fortemente ligado à celulose, como também visto em folha e colmo de cana-de-açúcar (de Souza *et al.*, 2012), por exemplo. Dentro das frações, a quantidade de ramificações aumenta do segmento 1 para o segmento 5. Isto poderia indicar que as ramificações são adicionadas ao xilano com o desenvolvimento da raiz ou um xilano mais ramificado é depositado na parede mais tardiamente.

Quanto à degradação deste polissacarídeo na formação do aerênquima, a localização com ouro coloidal indica que os xilanos detectados pelo anticorpo CCRC-M154 permanecem íntegros até o segmento 5, inclusive nas paredes ao redor dos espaços do aerênquima, e em poucos locais foi possível observar a sua degradação (Figura 24). Os resultados indicam que o AX é retirado apenas em alguns locais, provavelmente onde ocorre a degradação completa da parede, mas é mantido nas restantes.

β-glucano

A resposta do β-glucano (BG) no perfil glicômico não mostra variação deste polissacarídeo durante o desenvolvimento da raiz, indicando apenas quantidades levemente maiores nas frações oxalato de amônio e NaOH 4M. Enquanto isto, a proporção de Glc nos monossacarídeos diminui em todas as

frações, principalmente na fração NaOH 1M onde há uma variação de 48% entre os segmentos 1 e 5. Na fração NaOH 4M, a perda de Glc é de 18%. Estas grandes variações não são vistas no perfil glicômico na fração NaOH 1M, nem nos anticorpos para XG, nem no de BG – polissacarídeos que contêm Glc. Pode-se sugerir, portanto, que quantidade de BG esteja sendo subestimada pelo perfil glicômico e, por isto, não será considerado nesta discussão.

O perfil de monossacarídeos mostra uma redução ao longo dos segmentos na porcentagem de Glc em todas as frações, principalmente em NaOH 1M, sugerindo uma redução na quantidade de BG, uma vez que este polissacarídeo, de acordo com o perfil de oligossacarídeos, está presente nestas frações. O mesmo é observado por meio da imunolocalização, onde a quantidade de BG detectada reduz no córtex ao longo da raiz, mostrando que há degradação deste polissacarídeo. A degradação se inicia na região mais próxima à epiderme e aumenta centripetamente, coincidindo com a formação do aerênquima (Figura 17).

O β -glucano é conhecido como um polissacarídeo de transição, sintetizado em tecidos em alongamento e desaparecendo quando o alongamento diminui (Carpita, 1996; Kim *et al.*, 2000). Embora tenha havido degradação deste polissacarídeo na região do córtex, que coincide com a região do aerênquima, foi observado que ele não é retirado do cilindro vascular em nenhum dos cortes analisados. Em cana-de-açúcar, o β -glucano já foi observado em tecidos completamente desenvolvidos, como folha e colmo de plantas adultas (Silva, 2005).

Além destas alterações em BG, foi observado por meio da imunolocalização com ouro coloidal, um padrão diferencial de distribuição deste polissacarídeo na parte interterna da parede celular (Figura 24). O mesmo padrão já foi observado por outros autores em coleóptilo de milho e cevada (Willats *et al.*, 2001; Trethewey & Harris, 2002). Estes autores têm explicações divergentes para este fenômeno: enquanto os primeiros atribuem esta distribuição a uma deposição tardia de polissacarídeos (não só BG, como também pectinas) no desenvolvimento da parede, os segundos acreditam que, em cevada, isto ocorre devido à retirada de BG de regiões específicas.

Na raiz de cana-de-açúcar não foi realizado um estudo aprofundado utilizando ouro coloidal nas regiões meristemáticas, de forma que não é

possível confirmar o mecanismo que resulta na distribuição diferencial deste polissacarídeo. Podemos afirmar, através dos resultados de imunolocalização por fluorescência e perfil de oligossacarídeos, que o BG compõe a parede celular desde estágios iniciais do desenvolvimento (segmento 1) e, por isso, tem características semelhantes às aquelas discutidas por Trethewey e Harris (2002), onde haveria degradação localizada ou iniciada na região oposta à membrana plasmática.

De acordo com a literatura (Buckeridge *et al.*, 2004), o BG sintetizado e depositado resulta em um mecanismo físico de afrouxamento da parede que permite a expansão celular. Em seguida, este polissacarídeo é degradado como parte do mecanismo de reciclagem de açúcar. Portanto, a retirada do BG da parede deve torná-la mais rígida e menos acessível a outras hidrolases. Em um experimento de digestão sequencial com liquenase, seguida por xilanase, Crivellari (2012) viu uma pequena diminuição na quantidade de fragmentos produzidos pela segunda enzima, quando comparado com a ação da enzima sem a prévia retirada de β -glucano.

Devemos ressaltar que a enzima que degrada o BG é capaz de fazê-la de forma eficiente, mesmo sem a retirada de outros polissacarídeos prévia ou concomitantemente, como visto por de Souza e col. (2012) e Crivellari (2012). Com isto, podemos inferir que: 1) apesar de o BG ser fortemente ligado à celulose (Carpita, 1984), este está prontamente acessível às enzimas e a recalitrância da parede à hidrólise pouco interfere na sua degradação, como foi observado na digestão com liquenase da parede íntegra de colmo e folha de cana (de Souza *et al.*, 2012); 2) a enzima liquenase é bastante eficaz na hidrólise do BG, não sofrendo interferência de possíveis interações que impedem o acesso a este polissacarídeo ou 3) enzimas que modificam as interações entre os polissacarídeos da parede celular agem antes da liquenase, liberando o β -glucano para a sua degradação.

Pectinas

A presença de pectinas pode ser observada em todas as frações, como demonstrado pelo perfil glicômico (Figura 13) e pelo perfil dos monossacarídeos (Tabela 2), através da porcentagem de Gal nas amostras.

Embora a maior quantidade de pectinas tenha sido observada nas frações mais solúveis, esta também aparece em frações menos solúveis, sugerindo que uma parte destes polissacarídeos esteja mais fortemente associada às microfibrilas de celulose. Outros trabalhos com paredes celulares do tipo II, já demonstraram que a associação entre polissacarídeos pécticos e celulose pode ocorrer (Carpita *et al.*, 2001).

As pectinas diminuem ao longo do desenvolvimento do aerênquima em todas as frações, corroborando o observado na imunolocalização (Figuras 18-21), onde a marcação com os anticorpos diminui. Esta redução na intensidade de ligação ocorre principalmente nas paredes celulares ao redor dos espaços do aerênquima e entre estes espaços. Na imunolocalização com ouro coloidal (Figura 24), foi observada uma marcação específica, sendo esta relativa a pectinas presentes na junção triangular entre duas células vivas do segmento 5. Este fato reforça a ideia de que este grupo de polissacarídeos foi retirado do córtex nas regiões com aerênquima mais desenvolvido.

As pectinas localizadas com os anticorpos do grupo de cadeia principal de HG estão presentes em baixa proporção, como pode ser observado por meio dos resultados do perfil glicômico e da imunolocalização (Figuras 13 e 18). Na cana de açúcar, este polissacarídeo está presente apenas nas junções triangulares, diferentemente do que foi mostrado por Gunawardena e col. (2001b) para milho. Estes autores observaram um aumento na ligação do anticorpo JIM7 (o mesmo utilizado no presente estudo) em todas as paredes celulares das regiões com formação de aerênquima.

De acordo com a literatura, em paredes celulares do tipo I, a principal pectina da lamela média é o HG com baixo grau de esterificação, enquanto a pectina da matriz teria alto grau de esterificação (Jarvis *et al.*, 2003). Em raízes de milho, com paredes do tipo II, Gunawardena e col. (2001b) encontraram pectinas desesterificadas nos vértices das junções triangulares (identificadas com o anticorpo JIM5) em regiões sem formação de aerênquima e esta marcação mostrou um padrão de bandas nas paredes em volta dos espaços do aerênquima. No presente estudo foi utilizado um anticorpo similar (CCRC-M38) para a identificação de HG sem metilesterificações (Figura 18). Foi observado que a ligação do anticorpo ocorreu nos vértices das junções triangulares da mesma forma do que o observado em o milho. Embora a intensidade da

ligação tenha diminuído com a formação do aerênquima, não houve formação de um padrão de banda, como observado no milho. Em cana, a ligação do anticorpo CCRC-M38 foi igual àquela de JIM5 em milho, mostrando que a degradação de HG em cana-de-açúcar e milho se dá de forma diferenciada.

O grupo dos RG-I, assim como os anticorpos JIM13 e JIM14 do grupo AG, apresentou ligação em conteúdos citoplasmáticos. Este conteúdo citoplasmático aparece de forma concentrada na região mais próxima às paredes voltadas ao centro no segmento 1, em padrão mais difuso no segmento 2 e desaparece a partir do segmento 3. Estas são características de arabinogalactano ligado a proteínas (AGP), podendo estar associado à membrana plasmática ou à parede celular e envolvido na expansão celular (Carpita, 1996).

A fraca ligação dos anticorpos para AG na imunolocalização, comparada à resposta do perfil glicômico, pode indicar que os epítomos localizados por estes anticorpos são expostos com os reagentes utilizados no fracionamento da parede celular ou estes são perdidos durante o processamento para a imunolocalização. Entretanto, pode ser que este epítopo ainda esteja oculto em outro tecido, já que a ligação no perfil glicômico parece ser desproporcional à ligação apenas na epiderme. Por outro lado, os anticorpos JIM14 e JIM19 mostraram alguma relação com a formação do aerênquima, pois desaparecem das paredes que circundam os espaços de ar nos segmentos mais distantes do ápice (Figura 21). Ambos podem ser considerados como anticorpos que marcam variações em pectinas durante a formação do aerênquima em raiz de cana.

A retirada das pectinas é uma das primeiras modificações da parede celular na formação do aerênquima, juntamente com a degradação do β -glucano. A retirada das pectinas das junções triangulares e da lamela média permite a separação das células e em um processo análogo à formação de aerênquima esquizógeno (Evans, 2003).

8. Considerações finais e implicações biotecnológicas

A partir dos resultados obtidos durante o presente trabalho, é possível dizer que a formação do aerênquima nas raízes de cana-de-açúcar não está

diretamente relacionada à completa degradação das paredes das células corticais. Há degradação de β -glucano e de pectinas, principalmente daquelas associadas às lamelas médias, resultando na separação das células. A degradação destes polissacarídeos, juntamente com as alterações observadas em xiloglucano, possivelmente está relacionada à alteração das características físicas das paredes, tornando-as mais suscetíveis a dobras e colapsos, gerando os espaços de gás e lamelas resistentes, que sustentam estes espaços. Através da MET, foi observada a ruptura total da parede somente em alguns pontos. É possível que nestes pontos, que podem ser considerados pontos-chave para a degradação, a composição da parede celular seja diferenciada ou possua alguma outra característica particular que permita a ação de enzimas de degradação. O estudo de quais enzimas e qual a sinalização que ocorre para esta degradação são pontos fundamentais para o entendimento do processo como um todo. Estes estudos já estão sendo desenvolvidos pelo grupo e espera-se que, com o conjunto de informações geradas, seja possível auxiliar o desenvolvimento da tecnologia do bioetanol de segunda geração.

A composição da parede celular de cana-de-açúcar está sendo intensamente investigada pelo nosso grupo desde 2005, quando foi iniciada a caracterização dos polissacarídeos de diversos órgãos da variedade SP80-3280 e do colmo de *Saccharum spontaneum* (Silva, 2005). Desde então, este estudo vem sendo aprofundado com o intuito de produzir conhecimentos que auxiliem na melhoria do uso da cana para a conversão em combustível. De Souza (2007) avaliou os monossacarídeos da parede íntegra de folhas e colmos em concentrações de CO₂ ambiente e elevada. Mais tarde, Sousa (2011) apresentou um trabalho de degradação dos polissacarídeos de parede celular da palhada de cana em condições de campo e analisou a variação da composição de monossacarídeos das frações ao longo de 12 meses. De Souza e col. (2012) compararam a composição de mono e oligossacarídeos das frações de colmo e folha de cana utilizando diversas técnicas. Crivellari (2012) investigou a estrutura fina das hemiceluloses de cana.

Uma análise comparativa do presente trabalho e dos supracitados indica que há uma razoável variação nos resultados obtidos (Tabela 3), mesmo todos tendo sido realizados com a mesma variedade de cana (SP80-3280). Isto

indica que muitos fatores podem influenciar na composição da parede celular, como a idade da planta e a região analisada. Por outro lado, apesar das variações em suas proporções, os principais monossacarídeos dos diversos órgãos analisados são muito similares. As maiores variações observadas entre os estudos são relacionadas às frações mais solúveis. No presente estudo, o segmento 1 da raiz se destaca por ser menos similar aos outros órgãos. Isto provavelmente ocorre porque esta é uma região predominantemente meristemática, diferente das outras regiões analisadas. Em contrapartida, o segmento 5 se assemelha muito com outros órgãos. Desta forma, se considerarmos a possibilidade de alterar geneticamente a cana-de-açúcar para que enzimas que degradem e/ou modifiquem os polissacarídeos da parede celular, da mesma forma em que ocorre no aerênquima, sejam ativadas em outros tecidos da planta, seria possível fazer um pré-tratamento biológico do colmo e da folha a fim de facilitar a produção de etanol celulósico.

Tabela 3: Comparação das porcentagens de monossacarídeos neutros por frações da parede celular de cana-de-açúcar obtidas em diferentes trabalhos. De Souza *et al.*, 2012 [1]; Silva, 2005 [2]; Sousa, 2011 [3]. Cores indicam gradação nas porcentagens de monossacarídeos por coluna, variando de bege (valores menores) a laranja (valores maiores). Raiz – S1 (segmento 1) e raiz – S5 (segmento 5) são dados do presente trabalho. nd = não determinado pelo autor.

oxalato de amônio + clorito de sódio	Folha [1]	Folha [2]	Palhada 0 meses [3]	Palhada 12 meses [3]	Colmo [1]	Colmo [2]	Raiz [2]	Raiz - S1	Raiz - S5
Ara	12.2	6.0	14.2	16.8	11.4	19.0	9.0	12.5	17.0
Fuc	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.9	1.1
Gal	12.3	2.0	2.6	10.4	11.2	17.0	7.0	16.4	11.7
Glc	47.3	63.0	39.8	30.3	47.0	33.0	29.0	44.3	35.4
Man	2.6	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	2.0	1.8	1.2
Rha	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Xyl	25.2	28.0	43.4	74.6	28.0	31.0	53.0	24.1	33.7

NaOH 0,1M + 1M	Folha [1]	Folha [2]	Palhada 0 meses [3]	Palhada 12 meses [3]	Colmo [1]	Colmo [2]	Raiz [2]	Raiz - S1	Raiz - S5
Ara	13.5	11.0	20.7	13.4	11.1	13.0	9.9	17.1	16.3
Fuc	0.1	0.0	nd	nd	0.0	0.0	0.0	1.0	0.2
Gal	0.8	2.0	2.4	2.4	0.7	11.5	11.4	9.6	7.0
Glc	11.2	9.5	8.6	11.7	13.0	22.5	22.8	43.2	24.5
Man	0.9	2.0	nd	nd	0.5	0.0	0.0	0.6	0.0
Rha	0.1	0.0	nd	nd	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Xyl	73.4	75.5	68.4	72.5	74.7	53.0	55.9	28.6	51.9

NaOH 4M	Folha [1]	Folha [2]	Palhada 0 meses [3]	Palhada 12 meses [3]	Colmo [1]	Colmo [2]	Raiz [2]	Raiz - S1	Raiz - S5
Ara	5.40	5.00	7.03	3.56	2.00	13.00	8.00	7.10	6.50
Fuc	0.00	nd	nd	nd	0.00	nd	nd	0.00	0.10
Gal	0.60	12.00	1.13	1.19	1.20	4.00	5.00	8.10	3.70
Glc	52.40	61.00	55.12	60.77	63.30	22.00	24.00	64.30	52.40
Man	3.50	2.00	nd	nd	5.10	0.00	1.00	2.20	0.80
Rha	0.00	0.00	nd	nd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Xyl	36.10	20.00	36.72	34.49	26.30	61.00	62.00	18.20	36.50

9. Referências bibliográficas

- Armstrong J, Armstrong W** (1994) Chlorophyll development in mature lysigenous and schizogenous root aerenchymas provides evidence of continuing cortical cell viability. *New Phytologist* **126**: 493–497
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM** (2000) Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modeling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* **86**: 687–703
- Avci U, Pattathil S, Hahn MG** (2012) Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: immunolocalization of glycan epitopes. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) **908**: 73–82
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyiannis VF** (2007) Lysigenous aerenchyma development in roots – triggers and cross-talks for a cell elimination program. *International Journal of Plant Development Biology* 1(1): 127-140
- Brandão AD, Del Bem LEV, Vincentz M, Buckeridge MS** (2009) Expression pattern of four storage xyloglucan mobilization-related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1191–1206
- Buckeridge MS** (2007) Canavial versus floresta: um dilema estratégico pra o Brasil no século XXI. *Jornal da USP, São Paulo*, p. 6–7, 12 mar 2007
- Buckeridge MS** (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* **154**: 1017–1023
- Buckeridge MS, Cavalari AA, da Silva GB** (2008) Parede celular. In GB Kerbauy (org) *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 165–181
- Buckeridge MS, Lima DU, Dietrich SMC** (2000a) Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In AK Gupta, N Kaur (org) *Carbohydrate reserves in plants: synthesis and regulation*. Elsevier, Amsterdam, p. 283–316
- Buckeridge MS, dos Santos HP, Tiné MAS** (2000b) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 141–156
- Buckeridge MS, Rayon C, Urbanowicz B, Tiné MAS, Carpita NC** (2004) Mixed Linkage (1→3),(1→4)-β-D-Glucans of grasses. *Cereal Chemistry* **81**: 115–127
- Campbell R, Drew MC** (1983) Electron microscopy of gas spaces (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to oxygen shortage. *Planta* **157**: 350–357
- Carpita NC** (1984) Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant physiology* **76**: 205–212
- Carpita NC** (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 445–476

- Carpita NC, Defernez M, Findlay K, Wells B, Shoue DA, Catchpole G, Wilson RH, McCann MC** (2001) Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology* **127**: 551–565
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**: 1–30
- Cavalari AA** (2009) Modificações da parede celular de frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em diferentes estádios do desenvolvimento. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) Universidade Estadual de Campinas
- Clark LH, Harris WH** (1981) Observations on the root anatomy of rice (*Oriza sativa* L.). *American Journal of Botany* **68**: 154–161
- Colmer TD** (2003) Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment* **26**: 17–36
- Cortez LAB, Lora EES, Gómez EO** (2008) Biomassa para bioenergia. Unicamp, Campinas
- Crivellari AC** (2012) Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade de São Paulo
- Damásio ARL, Ribeiro LFC, Ribeiro LF, Furtado GP, Segato F, Almeida FBR, Crivellari AC, Buckeridge MS, Souza TACB, Murakami MT, Ward RJ, Prade RA, Polizeli MLTM** (2012) Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1824**: 461–467
- Dantas BF, Aragão CA, Alves JD** (2001) Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipóxia. *Scientia Agricola* **58**: 251–257
- de Souza AP** (2007) A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum* ssp. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Universidade Estadual de Campinas
- de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS** (2012) Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second generation bioethanol. *BioEnergy Research* (doi:10.1007/s12155-012-9268-1)
- Dillewijn C** (1952) Botany of sugarcane. *Chronica Botanica*, Waltham
- dos Santos HP, Purgatto E, Mercier H, Buckeridge MS** (2004) The control of storage xyloglucan mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. *Plant Physiology* **135**: 287–299
- Drew MC, He CJ, Morgan PW** (1989) Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by Nitrogen- or Phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiology* **91**: 266–71

- Drew MC, He CJ, Morgan PW** (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* **5**: 123–7
- Drew MC, Jackson MB, Giffard S** (1979) Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. *Planta* **147**: 83–88
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350–356
- Esau K** (1977) The anatomy of seed plants. John Wiley & Sons, New York
- Evans DE** (2003) Aerenchyma formation. *New Phytologist* **161**: 35–49
- Faostat** (2010) United Nations food and Agricultural Organization. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Faostat** (2012) United Nations food and Agricultural Organization. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA** (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* **119**: 493–501
- Gilbert RA, Rainbolt CR, Morris DR, Bennett AC** (2007) Morphological responses of sugarcane to long-term flooding. *Agronomy Journal* **99**: 1622–1628
- Goldemberg J** (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science* (New York, NY) **315**: 808–10
- Goldemberg J** (2010) The role of biomass in the world's energy system. In MS Buckeridge, GH Goldman (org) *Routes to cellulosic ethanol*. Springer, New York, p 3–14
- Goldemberg J, Coelho ST, Guardabassi P** (2008) The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy* **36**: 2086–2097
- Gorshkova T a., Wyatt SE, Salnikov VV, Gibeaut DM, Ibragimov MR, Lozovaya VV, Carpita NC** (1996) Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* **110**: 721–729
- Gunawardena A H, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE** (2001a) Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* **212**: 205–14
- Gunawardena a. HL a. N, Pearce DME, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE** (2001b) Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant, Cell and Environment* **24**: 1369–1375

- He C, Finlayson S a., Drew MC, Jordan WR, Morgan PW** (1996a) Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiology* **112**: 1679–1685
- He C, Morgan PW, Drew MC** (1996b) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiology* **112**: 463–472
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP** (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment* **26**: 977–989
- Jones AM** (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* **125**: 94–7
- Justin SHFW, Armstrong W** (1991) Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* **118**: 49–62
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero R a., Nishiguchi M, Uchimiya H** (1998) Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* **204**: 277–287
- Kim JB, Olek a T, Carpita NC** (2000) Cell wall and membrane-associated exo-beta-D-glucanases from developing maize seedlings. *Plant Physiology* **123**: 471–86
- Lee J** (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* **56**: 1–24
- Leite DCC, dos Santos WD, Buckeridge MS** (2010) Effects of phenylpropanoid synthesis inhibition on sugarcane development. *Anais do 2º Panamerican Congress on Plants of Bioenergy*
- Lenochová Z, Soukup A, Votrubová O** (2009) Aerenchyma formation in maize roots. *Biologia Plantarum* **53**: 263–270
- Levy S, York WS, Stuike-Prill R, Meyer B, Staehelin LA** (1991) Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *The Plant Journal* **1**: 195–215
- Lima DU, Santos HP, Tiné M a., Molle FRD, Buckeridge MS** (2001) Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* **24**: 191–198
- Macedo IC** (2005) A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. *ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, São Paulo*
- Macedo IC** (2007) Situação atual e perspectivas do etanol. *Estudos Avançados* **21**: 157–165

- Malik A, Colmer T, Lambers H, Schortemeyer M** (2003) Aerenchyma formation and radial O₂ loss along adventitious roots of wheat with only the apical root portion exposed to O₂ deficiency. *Plant, Cell and Environment* **26**: 1713–1722
- Martins MTB** (2011) Caracterização bioquímica e molecular de cana-de-açúcar durante a fase de senescência foliar com ênfase na parede celular. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília
- Mortimer JC, Miles GP, Brown DM, Zhang Z, Segura MP, Weimar T, Yu X, Seffen KA, Stephens E, Turner SR, Dupree P** (2010) Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *PNAS* **107**: 17409–14
- Pattathil S, Avci U, Baldwin D, Swennes AG, McGill JA, Popper Z, Bootten T, Albert A, Davis RH, Chennareddy C, Dong R, O'Shea B, Rossi R, Leoff C, Freshour G, Narra R, O'Neil M, York WS, Hahn MG** (2010) A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiology* **153**: 514–525
- Pattathil S, Avci U, Miller JS, Hahn MG** (2012) Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: Glycome Profiling. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) **908**: 61–72
- Rajhi I, Yamauchi T, Takahashi H, Nishiuchi S, Shiono K, Watanabe R, Mliki A, Nagamura Y, Tsutsumi N, Nishizawa NK, Nakazono M** (2011) Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *The New Phytologist* **190**: 351–68
- Saab IN, Sachs MM** (1996) A flooding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *Plant Physiology* **112**: 385–91
- Saeman JF, Bubl JL, Harris EE** (1945) Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **17**: 35–37
- Schussler EE, Longstreth D** (2000) Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany* **87**: 12–19
- Selig MJ, Adney WS, Himmel ME, Decker SR** (2009) The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Cellulose* **16**: 711–722
- Sexton R, Roberts JA** (1982) Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 133–162
- Silva AM** (2005) Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária). Tese (Doutorado em Biologia Celular) Universidade Estadual de Campinas

- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS** (2011) Cell wall polysaccharides from fern leaves: evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry* **72**: 2352–60
- Smirnoff N, Crawford RMM** (2003) Variation in the structure and response to flooding of root aerenchyma in some wetland plants. *Annals of Botany* **51**: 237–249
- Smith DM, Inman-Bamber NG, Thorburn PJ** (2005) Growth and function of the sugarcane root system. *Field Crops Research* **92**: 169–183
- Socol CR, Vandenberghe LPDS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, Pitarelo AP, Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, et al** (2010) Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource technology* **101**: 4820–5
- Sousa CR** (2011) Caracterização da mobilização dos polissacarídeos da parede celular em palhada de cana-de-açúcar submetida às condições de campo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo
- Tiné MAS, de Lima DU, Buckeridge MS** (2003) Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans. *Carbohydrate Polymers* **52**: 135–141
- Tiné MAS, Silva CO, Lima DU de, Carpita NC, Buckeridge MS** (2006) Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Carbohydrate Polymers* **66**: 444–454
- Tonini PP** (2004) Papel do tegumento e do ácido abscísico no processo de degradação do galactomanano em sementes de *Sesbania virgata*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Universidade Estadual de Campinas
- Tonini PP, Purgatto E, Buckeridge MS** (2010) Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany* **106**: 607–616
- Trethewey JAK, Harris PJ** (2002) Location of (1 3)- and (1 3),(1 4)-beta-D-glucans in vegetative cell walls of barley (*Hordeum vulgare*) using immunogold labelling. *New Phytologist* **154**: 347–358
- Vincken J** (1996) Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase. *Carbohydrate Polymers* **29**: 75–85
- Willats WG, McCartney L, Mackie W, Knox JP** (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* **47**: 9–27

10. Anexos

Anexo 1: Detecção da morte celular programada por meio do teste de TUNEL. Os núcleos das células em morte celular programada são marcados nos segmentos 2, 3, 4 e 5 (**F, J, N e R**, respectivamente), mas não no segmento 1 (**B**). Os controles positivos dos segmentos 1-5 (**C, G, K, O e S**, respectivamente) indicam onde há núcleo. Os controles dos segmentos 1-5 com coloração de safrablau (**A, E, I, M e Q**, respectivamente) indicam a região aproximada do corte. Os controles negativos dos segmentos 1-5 (**D, H, L, P e T**, respectivamente) indicam que a marcação do teste não é inespecífica. Barra=400µm.

Anexo 2: Controle do perfil dos oligossacarídeos das frações de parede celular dos segmentos de raiz (S1-S5) sem tratamento enzimático

Anexo 3: Controle das enzimas utilizadas para perfil de oligossacarídeos sem adição de substrato.

Anexo 5: Imunolocalização com ouro coloidal em microscopia eletrônica de transmissão. Localização de xilanos com o anticorpo CCRC-M154 por todas as paredes colapsadas e em menor quantidade no conteúdo intercelular **(A)** e em parede em maior grau de degradação **(B)**. Identificação de β -glucano com o anticorpo BG1 na porção interna da parede celular de uma célula viva, adjacente a paredes colapsadas **(C)**. Evidência de homogalacturonanos na parede de células vivas e em conteúdo intercelular na região da junção triangular **(D)**. Barra=10 μ m.

Anexo 5: Perfil glicômico com valores de absorvância multiplicados pelo rendimento das frações de parede celular separados por segmentos (números). Abaixo a palheta de cores em relação à absorvância, variando de baixa absorvância (preto) a alta absorvância (amarelo). À direita localizam-se os números dos anticorpos e o grupo a qual pertencem. **Non-fuc XG**: xiloglucano não-fucosilado; **Fuc XG**: xiloglucano fucosilado; **Acetylated mannan**: manano acetilado; **HG Backbone**: cadeia principal de homogalacturonano; **RG-I Backbone**: cadeia principal de ramnogalacturonano-I; **Linseed mucilage RG-I**: ramnogalacturonano de mucilagem de linhaça; **RG-I**: ramnogalacturonano-I; **AG**: arabinogalactano.

Anexo 6: Legenda dos anticorpos do perfil glicômico em maior aumento para identificação de seus números. **Non-fuc XG**: xiloglucano não-fucosilado; **Fuc XG**: xiloglucano fucosilado; **Acetylated mannan**: manano acetilado; **HG Backbone**: cadeia principal de homogalacturonano; **RG-I Backbone**: cadeia principal de ramnogalacturonano-I; **Linseed mucilage RG-I**: ramnogalacturonano de mucilagem de linhaça; **RG-I**: ramnogalacturonano-I; **AG**: arabinogalactano