

THIAGO ALVES NAPOLEÃO

**EFEITOS DO METIL JASMONATO E ÁCIDO SALICÍLICO NA COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR, METABOLISMO SECUNDÁRIO E RECALCITRÂNCIA EM *Brachypodium distachyon***

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N216e  
2015 Napoleão, Thiago Alves, 1990-  
Efeitos do metil jasmonato e ácido salicílico na composição da parede celular, metabolismo secundário e recalcitrância em *Brachypodium distachyon* / Thiago Alves Napoleão. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Brachypodium distachyon*. 2. Digestibilidade.  
3. Sacarificação. 4. Ácidos hidroxicinâmicos. 5. Energia - Fontes alternativas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 585.9

THIAGO ALVES NAPOLEÃO

**EFEITOS DO METIL JASMONATO E ÁCIDO SALICÍLICO NA COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR, METABOLISMO SECUNDÁRIO E RECALCITRÂNCIA EM *Brachypodium distachyon***

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 17 de julho de 2015.

---

Wagner Luiz Araújo

---

Camilo Elber Vital

---

Marcelo Ehlers Loureiro  
(Orientador)

Dedico a minha família e em especial aos meus pais Onias e Adriana. À minha namorada Beatriz por compartilhar toda essa trajetória ao meu lado.

**Amo vocês**

**Obrigado!**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir concluir mais uma etapa da minha vida;

Aos meus pais Onias e Adriana e a toda minha família que me incentivaram e apoiaram em todos os objetivos que me propus a fazer, em especial esta etapa que sem eles não seria possível;

À minha namorada Beatriz por toda ajuda que tive em todos os momentos que precisei com seu positivismo, pela sua motivação e também por sua paciência;

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal Molecular, em especial Ana Carla, Andrea Giordano, Carla Bastos e Giuliana Mourão que foram ótimas pessoas que encontrei nesta pequena jornada e que foram inevitáveis para conclusão deste trabalho e que foi um grande prazer conhece-las;

À Capes pela concessão da bolsa;

À Universidade Federal de Viçosa, e em especial ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e aos professores pelos ensinamentos de excelência e contribuições ao longo do curso;

Ao professor Marcelo E. Loureiro pela orientação;

Agradeço imensamente Andrea Giordano pela coorientação, paciência e atenção;

Aos integrantes Camilo e Nívea do Núcleo de Biomoléculas pelas análises realizadas;

À todos os técnicos da Fisiologia Vegetal pela ajuda quando necessária;

Aos amigos que conheci durante estes anos pelo ótimo convívio, pelas conversas divertidas, pelo apoio, ajuda e pelos “cafezinhos” de cada dia;

À “pelada” sagrada de todas as quartas-feiras;

Aos amigos da república “Pantanal” Acácio e Roberto.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	6
2.1 Material vegetal e condições de cultivo .....	6
2.2 Aplicação dos tratamentos .....	6
2.3 Expressão gênica .....	6
2.3.1 Extração de RNA.....	7
2.3.2 Síntese de cDNA .....	7
2.3.3 PCR em Tempo Real .....	7
2.4 Análise química da parede celular .....	9
2.4.1 Isolamento da parede celular .....	9
2.4.2 Determinação de celulose.....	9
2.4.3 Determinação de monossacarídeos da hemicelulose.....	10
2.4.4 Determinação do teor de lignina.....	11
2.5 Sacarificação .....	11
2.5.1 Pré-tratamento ácido.....	11
2.5.2 Hidrólise enzimática .....	11
2.5.3 Determinação de glicose.....	12
2.6 Determinação de fenóis solúveis totais .....	12
2.7 Perfil metabólico de compostos secundários e quantificação de fitohormônios..	12
2.7.1 Extração .....	12
2.7.2 Cromatografia Líquida de ultra eficiência em tandem com espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).....	13
2.8 Parâmetros biométricos .....	14

2.9 Delineamento experimental e análise estatística.....	14
3. RESULTADOS.....	15
3.1 Efeito da aplicação exógena de metil jasmonato e ácido salicílico no crescimento de plantas de <i>Brachypodium</i> .....	15
3.2 Perfil hormonal em <i>B. distachyon</i> em resposta a aplicação exógena de MJ e AS	16
3.3 Efeito dos hormônios MJ e AS no teor de celulose da parede celular .....	18
3.4 Conteúdo dos principais açúcares da hemicelulose em tecidos de folha e colmo em resposta a aplicação exógena dos hormônios e razões arabinose/celulose; parede celular/massa seca. ....	18
3.5 Efeito dos hormônios MJ e AS no teor de lignina total e razão celulose/lignina	20
3.6 Efeito da aplicação de MJ e AS no teor de fenólicos totais .....	22
3.7 Alteração do perfil de metabólitos secundários em resposta a aplicação de MJ e AS.....	22
3.8 Análise de expressão gênica.....	24
3.9 Efeito da aplicação exógena de hormônios na sacarificação da parede celular. ..	27
3.10 Correlações entre composição da parede celular e eficiência da sacarificação .	27
4. DISCUSSÃO .....	30
4.1 Aplicações exógenas de MJ e AS reduzem o crescimento em <i>Brachypodium</i> ....	30
4.2 Aplicação exógena de MJ e AS altera a concentração de vários hormônios .....	30
4.3 MJ e AS alteram a composição da parede celular.....	31
4.4 MJ e AS afetam marcadamente o metabolismo secundário em <i>Brachypodium</i> e não pode ser explicado por alterações na expressão genica.....	33
4.5 Aumento da recalcitrância em resposta ao SA não é explicada por alterações no teor de lignina e celulose.....	35
CONCLUSÕES .....	37
5. REFERÊNCIAS.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

4CL: 4-cumarato coenzima A ligase

ABA: ácido abscísico

ACC: ácido aminociclopropano carboxílico

AIA: ácido indol acético

AS: Ácido salicílico

BAHD: acetiltransferase

C3H: *p*-cumarato 3-hidrolase

C4H: trans-cinamato 4-hidrolase

CCoAMT: cafeoil-CoA *o*-metiltransferase

CCR: Cinamoil-CoA reductase

CESA4: celulose sintase 4

CESA7: celulose sintese 7

COMT: ácido caféico *O*-metiltransferase

F5H: ferulato-5-hidroxilase

FA- ácido ferúlico

GAX: glucuronoarabinoxilano

HCT: hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferase

JÁ: ácido jasmônico

MJ: Metil Jasmonato

PAL: Fenilalanina amônia-liase

*p*-CA: ácido *p*-cumárico

## RESUMO

NAPOLEÃO, Thiago Alves. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Efeitos do metil jasmonato e ácido salicílico na composição da parede celular, metabolismo secundário e recalcitrância em *Brachypodium distachyon***. Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientadora: Andrea Giordano.

Fontes de energia alternativas e sustentáveis têm recebido enorme atenção devido ao aumento dos preços, da esgotabilidade e dos problemas ambientais associados ao petróleo, tornando a produção de biocombustíveis de segunda geração um objeto de grande interesse internacional. As gramíneas são as principais fontes destes biocombustíveis, e *Brachypodium distachyon* foi eleita um modelo para o estudo das gramíneas. Plantas em estágio juvenil foram avaliadas após o tratamento por duas semanas com metil jasmonato (MJ) ou ácido salicílico (AS) (ambos 100  $\mu$ M). Os dois tratamentos reduziram o alongamento foliar, provavelmente resultante do efeito da inibição da elongação celular e divisão celular associadas com o aumento do ácido ferúlico (FA), ácido p-cumárico (p-CA) e ABA, e com a redução no teor de AIA. A aplicação de MJ e AS também produziu vários efeitos na parede celular das folhas, como o aumento da celulose (MJ), xilose, arabinose e galactose (ambos tratamentos), aumento das razões arabinose/celulose (AS) e parede celular/massa seca total (MJ), e redução do teor de lignina (AS). Em paralelo a estas mudanças, houve aumento de fenóis solúveis totais, ácido cafeico e naringerina (para ambos tratamentos), e ácido sinápico (AS). Estas alterações não foram explicadas por mudanças na expressão de 12 genes da rota de biossíntese da parede estudados. A aplicação de AS reduziu em 15% a eficiência da sacarificação enzimática. Este efeito foi fortemente correlacionado negativamente com o aumento de FA, p-CA, e arabinose, mas não se correlacionou com o teor de lignina. Embora o tratamento com MJ tenha aumentado os teores de FA e p-CA, este efeito foi contraposto pelo simultâneo aumento da celulose. Os resultados obtidos demonstram a importância do AS e do MJ para a regulação dos componentes e da digestibilidade da parede celular, e a influência dos metabólitos secundários na recalcitrância da parede à sacarificação.

## ABSTRACT

NAPOLEÃO, Thiago Alves. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on cell wall composition, secondary metabolites and cell wall recalcitrance in *Brachypodium distachyon***. Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-adviser: Andrea Giordano.

Renewable and sustainable sources of energy have received a lot of attention, due to the price fluctuations and environmental issues associated with the depletion of oil reserves, prompting worldwide interest in the production of second generation biofuels. Grass species are the main biomass resources used in biofuel production, and *Brachypodium distachyon* was described as a model species for grasses and cereals. Juvenile plants were analyzed after two weeks treatment with methyl jasmonate (MJ) or salicylic acid (SA) (both at 100  $\mu$ M). Both treatments reduced leaf growth rate, probably because of an inhibitory effect on cellular elongation and division, caused by an increase in ferulic acid (FA), p-coumaric acid (p-CA) and ABA, and lower levels of IAA. Modifications in cell wall compounds were observed mainly in leaf tissues, such as an increase of cellulose (MJ), xylose, arabinose and galactose (both treatments), arabinose/cellulose ratio (SA), and cell wall/biomass ratio (MJ), and reduction of lignin content (SA). There was an increase in total phenolic content, caffeic acid and narigenin (for both treatments), and in sinapic acid (SA). Alterations of these compounds could not be related to the expression of 12 genes involved in cell wall biosynthesis. The application of SA reduced in 15% the saccharification yield. This effect was strongly negative correlated with higher levels of FA, p-CA and arabinose, but was not associated with lignin content. MJ treatment also increased the levels of FA and p-CA, but changes in saccharification yield were not observed, possibly caused by an increase in cellulose content. These results show the importance of SA and MJ in the regulation of cell wall compounds and digestibility, and the influence of secondary metabolites in cell wall saccharification recalcitrance.

## 1. INTRODUÇÃO

*Brachypodium distachyon* pertence à família Poaceae, que abrange mais de 700 gêneros e 10.000 espécies (Souza & Lorenze, 2012), e contém algumas das principais culturas economicamente importantes no mundo, como arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), (Bevan *et al.*, 2010). Este grupo de plantas é responsável pela maior parte da alimentação humana seja diretamente pelo consumo dos grãos ou indiretamente como fonte de alimentação para gado. Outra grande importância das gramíneas é a obtenção da biomassa lignocelulósica para produção de biocombustíveis, realizada a partir de processos químicos e biológicos (Yang & Wyman, 2008).

Atualmente o modelo mais usado em plantas é *Arabidopsis thaliana*, que é, filogeneticamente distante das principais culturas e gramíneas forrageiras encontradas no mundo (Keller & Feuillet, 2000). *B. distachyon* apresenta-se assim como uma espécie modelo para as Poáceas devido às características como genoma com tamanho reduzido, ecótipos diplóides, relativa facilidade de transformação genética, poucas exigências para seu crescimento, ciclo de vida curto e pequena estatura morfológica (Draper *et al.*, 2001; Brkljadic *et al.*, 2011; Mur *et al.*, 2011; Girin *et al.*, 2014). Além disso, o seu genoma já foi completamente (International, 2010).

Em virtude de suas características, nos últimos anos, a espécie *B. distachyon* tem sido utilizada como modelo para gramíneas e cereais (Garvin, 2008; Vogel & Bragg, 2009; Bevan *et al.*, 2010; Brkljadic *et al.*, 2011). Por isso, tornou-se atrativa para estudos com parede celular, devido a semelhança da composição de sua parede com a das principais culturas voltadas para a produção de biocombustíveis (Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2013).

A parede celular dos vegetais compreende a maior fonte de energia renovável do mundo, e sua composição pode influenciar sua recalcitrância (Pauly & Keegstra, 2008). Dentre outros componentes químicos, a lignina é considerado um dos principais elementos recalcitrantes, por impor dificuldade ao acesso dos polissacarídeos da parede celular, sendo uma das causas mais importantes dos elevados custos para produção de biocombustíveis (Zeng *et al.*, 2014).

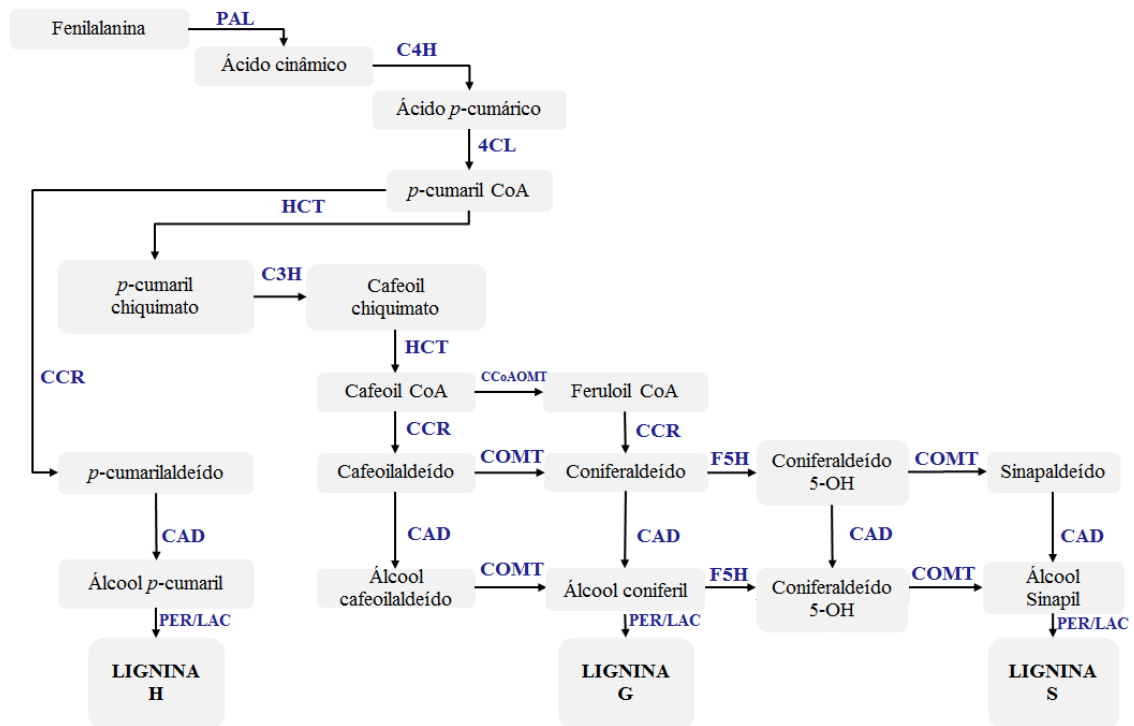
A lignina é um polímero de fenilpropanóides complexo, originado a partir dos álcoois sinapil, coniferil e *p*-cumaril, que caracterizam, respectivamente, as ligninas S (sinrigil), G (guaiacil) e H (*p*-hidroxifenil), a ligação de maior ocorrência entre estas unidades é do tipo  $\beta$ -O-4 (éter-arila) (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004). Além da lignina, outros fatores contribuem para recalcitrância da parede celular. Em gramíneas o conteúdo de hidroxicinâmico, em particular ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico podem formar ligações cruzadas com a lignina, polissacarídeos e proteínas da parede celular, alterando conseqüentemente sua digestibilidade. A estrutura lignina/hemicelulose, a porosidade da biomassa e a cristalinidade da celulose também contribuem para alteração da recalcitrância (de O. Buanafina, 2009; Ralph, 2010; Molinari *et al.*, 2013; Pu *et al.*, 2013; Matias de Oliveira *et al.*, 2014).

Com a finalidade de tornar mais eficiente o processamento do material lignocelulósico, visando a redução dos custos da produção de biocombustíveis, e possibilitar alta competitividade no mercado, várias alternativas têm sido investigadas, que incluem o desenvolvimento de plantas transgênicas com mudanças na expressão de genes que alteram a parede celular, como também diferentes tecnologias na etapa de pré-tratamento (Shadle *et al.*, 2007; Yang & Wyman, 2008; Fu *et al.*, 2011; Mansfield *et al.*, 2012a; Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2013; Trabucco *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2014; Ookawa *et al.*, 2014).

Assim como na produção de biocombustível e na indústria papelreira, os sistemas baseados em pastagem visam obter plantas com parede celular menos recalcitrante. A utilização de gramíneas forrageiras para a alimentação de animais ruminantes possui como principal entrave em termos de rendimento a recalcitrância da parede celular. Os materiais potencialmente digeríveis vão se tornando menos acessíveis para as bactérias ruminais com o avanço da lignificação da parede celular (Jung *et al.*, 2012). Neste cenário, *B. distachyon* torna-se um importante sistema modelo para estudos de manipulação da composição e digestibilidade da parede celular de gramíneas forrageiras (Rancour *et al.* 2012).

Atualmente, vários estudos têm investigado as mudanças que ocorrem na parede celular em função das alterações na expressão dos genes da via biossintética dos monolignóis (Figura1), que possui como principais enzimas: fenilalanina amônia liase (PAL); hidroxicinamoil COA Ligase (4CL); cinamato 4-hiroxilase (C4H); hidroxicinamoil CoA:chiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase (HCT); 4-Hidroxicinamato

3-Hidroxilase (C3'H); cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT); cinamoil-CoA redutase (CCR); ferulato-5-Hidroxilase (F5H); ácido caféico O-metiltransferase (COMT) e cinamil álcool desidrogenase (CAD), (Chen & Dixon, 2007; Shadle *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2011; Mansfield *et al.*, 2012b; Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Trabucco *et al.*, 2013; Van Acker *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Marriott *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014).



**Figura 1** – Via da biossíntese de lignina (adaptado de Li *et al.* (2008))

Além da manipulação dos genes envolvidos na rota dos monolignóis, outro alvo para manipulação no controle da rota fenilpropanóides tem sido os fatores de transcrição da família MYB e NAC (Zhong *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012). Atualmente, novas estratégias estão sendo estudadas para reduzir a recalcitrância da parede celular em tecidos alvo, através do uso de construções gênicas com promotores tecido-específicos (Eudes *et al.*, 2014).

Contudo, um dos principais desafios destes estudos é obter mudanças significativas na recalcitrância da parede celular a ponto de melhorar o aproveitamento das culturas, sem que haja impacto sobre a aptidão agrônômica da planta (Pedersen *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2012; Bonawitz & Chapple, 2013; Zhao & Dixon, 2014).

A constante exposição das culturas às perturbações ambientais, provocadas por diferentes estresses bióticos ou abióticos, limita o crescimento e a produção de biomassa. A recalcitrância da parede celular também pode sofrer modulações em resposta a fatores abióticos, como baixa temperatura, seca, luz, e deficiência de minerais, estes têm sido relatados em perturbações no conteúdo de lignina (Moura et al, 2010). Em estudos recentes, o excesso de nitrogênio em Eucaliptos resultou em diminuição no teor de lignina, (Camargo *et al.*, 2014), enquanto que, em calos de videira, o déficit de nitrogênio promoveu acréscimo (Fernandes *et al.*, 2013). E Cass *et al.* (2015) observaram que respostas a estresses por luz UV e seca em duplo mutante (*PAL1* e *PAL2*) em *B. distachyon* responderam diferentemente de duplos mutantes para os mesmos genes em *Arabidopsis*, sugerindo que nem todos resultados em eudicotiledônia pode ser representável para uma espécie de gramínea.

Os estresses bióticos como agentes patogênicos e herbivoria causam perturbações na rota de fenilpropanóides levando à alterações na biossíntese de lignina, assim como nos flavonoides, taninos, entre outros compostos fenólicos envolvidos na proteção das plantas (Vogt, 2010; de Jong *et al.*, 2015). Os hormônios vegetais representam grande importância na mediação às respostas aos estresses. Entre eles, o ácido salicílico e o ácido jasmônico são as principais moléculas sinalizadora envolvidas na regulação de respostas de defesa contra perturbações causadas por agentes patogênicos e pragas, que por sua vez acarretam em alterações no metabolismo secundário (Glazebrook, 2005; Bari & Jones, 2009; Vogt, 2010), assim afetando os teores de compostos com importante papel na recalcitrância.

A maior parte dos estudos de parede celular foram realizados com eudicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*) (Liepman *et al.*, 2010). Posto que, a parede celular de uma gramínea diferencia-se grandemente em relação às eudicotiledôneas, incluindo, tipo e abundância de polissacarídeos não celulósicos, proteínas, compostos fenólicos e as interconexões entre estes componentes. Uma marcante característica nas monocotiledôneas é presença de glucuronoarabinoxilana (GAX) na qual encontra-se interligadas com polissacarídeos e lignina pela presença dos hidroxicinamatos (ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico) (Vogel, 2008). A investigação dos fatores que perturbam a parede celular de monocotiledoneas é de extrema relevância.

Diante da importância de estudos com parede celular em uma espécie modelo para gramíneas, o objetivo do trabalho é investigar as alterações provocadas no metabo-

lismo secundário e na parede celular em respostas as aplicações dos hormônios ácido salicílico e metil jasmonato, relacionando suas consequências na digestibilidade da parede celular como fonte de potencial bioenergético.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e condições de cultivo

A condução do experimento foi realizada em câmara de crescimento do tipo BOD, com temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , intensidade lumínica de  $250\text{ }\mu\text{m}^2\text{ s}^{-1}$  de fótons e fotoperíodo 12/12 para evitar o florescimento das plantas. Sementes de *Brachypodium distachyon* (Bd21) foram vernalizadas em placas de *Petri* a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  no escuro por cinco dias. Posteriormente, foram transferidas para BOD em “cartuchos” montados com papel Germitest®, mantidos úmidos por duas semanas. As plântulas foram transferidas para vasos de 1,5 litros (cinco plântulas por vaso) contendo solução nutritiva de Hogland modificada à  $\frac{1}{4}$  de força iônica, por quatro dias, posteriormente foram mantidas por mais quatro dias à  $\frac{1}{2}$  força. Em seguida, a solução foi substituída para força total e mantida até o final do experimento. A solução nutritiva foi substituída a cada cinco dias e o pH foi mantido em 5,7, assim como a aeração dos vasos constantes.

### 2.2 Aplicação dos tratamentos

Após o período de 27 dias de crescimento em força total, os tratamentos foram aplicados via pulverização. Um grupo de plantas recebeu o tratamento com  $100\text{ }\mu\text{M}$  metil jasmonato (MJ) em uma solução contendo 0,15 % *tween* 20. Um outro grupo recebeu o tratamento com  $100\text{ }\mu\text{M}$  ácido jasmonico (AS) em uma solução contendo 0,15 % *tween* 20. E um terceiro grupo foi mantido como controle (CT) recebendo uma solução contendo 0,15 % de *tween* 20. O *tween* 20 foi adicionado nas soluções afim de quebrar tensão superficial da água e conseqüentemente aumentar área de superfície de contato com os tecidos da planta. Após cada aplicação os vasos foram cobertos por sacos plásticos por 30 minutos. Foram realizadas 4 aplicações com intervalo de 3 dias entre elas.

### 2.3 Expressão gênica

### 2.3.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de plantas após 14 dias à aplicação de cada tratamento. Foram coletadas folhas que desenvolveram no período de exposição aos hormônios. A extração de RNA seguiu o método Trizol, macerados em nitrogênio líquido. O preparo do reagente Trizol foi feito utilizando 38 % de fenol ácido pH 4,5; 0,8 M de tioceanato de guanidina; 0,4 M tiocianato de amônio; 0,1 M acetato de sódio pH 5,0; 5 % de glicerol completando o volume final com água tratada com DEPC. Ao tecido macerado em nitrogênio líquido (100-150 mg) foi acrescentado 1 mL de Trizol, o sobrenadante foi centrifugado com clorofórmio para a separação das fases. A fase aquosa contendo o RNA foi separado e precipitado com igual volume de isopropanol gelado. Em seguida, os *pellets* foram lavados com álcool 75 % por duas vezes. Após ressuscitado em 20  $\mu$ L de água livre de RNases, o RNA foi quantificado e tratado com DnaseI Fermentas) seguindo o protocolo do fabricante. A integridade foi checada por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %. Equipamento QIAxpert System (*QIAGEN*) foi utilizado para a determinar a concentração e qualidade do RNA (razão 260/280 acima de 1,7).

### 2.3.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total (1 $\mu$ g) utilizando o Kit Improm-IITM Reverse Transcription System (*Promega*), seguindo o protocolo do fabricante. Padronizando 1  $\mu$ g de RNA, foram feitas as sínteses de cDNA. As amostras foram conservadas no freezer a -20 °C até o uso do mesmo.

### 2.3.3 PCR em Tempo Real

A expressão dos genes foi avaliada por análise em PCR em tempo real através do equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System, (*Life technologies*), pelo sistema de detecção SYBR Green I. Pares de *primers* foram desenhados no site QuantPrimer (<http://www.quantprime.de/>) e os parâmetros foram conferidos nos sites OligoCalc e Oligo Analyzer (<http://www.basic.northwestern.edu/>; [www.idtdna.com/](http://www.idtdna.com/)). Foram utilizados *primers* para genes relacionados com a síntese da parede celular. Para normaliza-

ção dos dados de expressão gênica foram utilizados os genes de referência UBI4 e GAPDH (Tabela 1).

Para a reação foi utilizado 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix, segundo recomendações do fabricante. Para cada combinação de *primers*, foi realizada a otimização da reação usando um *pool* dos cDNAs. As reações foram incubadas por 12 min a 95 °C e 40 ciclos de: 15 s a 95 °C; 20 s a 60-65 °C (a depender do *primer*) e 20 s 72 °C. Ao final de 40 ciclos, feita a curva de melting. Os dados foram analisados no programa StepOne Software (Versão 2.3). Para leitura das amostras três réplicas biológicas foram utilizadas. Os resultados foram expressos em expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

**Tabela 1:** Sequências de *primers* com seus respectivos genes.

Primer	Sequência	Temperatura de Anelamento (°C)	Gene
Bd_PAL_F1	TCGAGCTCCTCAGGCATCTGA	60	Bradi3g49250
Bd_PAL_R2	TGCCGGAGTAGCCCTGGAGAA		
Bd_CCR_F	ACCGCCAAGTGCCAAGTCGAC	60	Bradi3g54950
Bd_CCR_R	TGACCGTATTGCTGCAGGGACAT		
Bd_CC <sub>o</sub> AMOT_F	ATCCTGGAGACGAGCGTGTACC	60	Bradi1g48370
Bd_CC <sub>o</sub> AMOT_R	ATCAGGTTCCATGGGTGGTTGGC		
Bd_COMT_F	ATGGAGAGCTGGTACTACCTGAAGG	60	Bradi3g16530
Bd_COMT_R	CGACATCCCGTATGCCTTGTTGAATG		
Bd_4CL3_F	AGGAGGCCGCTGTTGTATCATTG	60	Bradi3g05750
Bd_4CL3_R	ACGAACGCGACAGGGATTTCAC		
Bd_C4H_F	GGAGAAGACTGGTGAGATCAGGTG	60	Bradi2g31510
Bd_C4H_R	GATGGCTGCGACGTTGATGTTC		
Bd_C3H_F	ACAGTATGACCTTAGCGACGACAC	60	Bradi2g21300
Bd_C3H_R	TCCAGCAGTGATCATGTCCCATAG		
Bd_HCT_F	CACGTATAGAGGAGAGACCTTCGC	60	Bradi3g48530
Bd_HCT_R	CCGCACCGTGATCTTCATCTTG		
Bd_F5H_F	ATGGACGTGATGTTCGGCGG	65	Bradi3g30590
Bd_F5H_R	ACGGGCTGTGCATCATCTCC		
Bd_CESa4_F	TTTCGCATACACCAACACCATCG	60	Bradi3g28350
Bd_CESa4_R	CTCGCTAGGTTGTTTCAGTGTGG		
Bd_CESa7_F	GGCAACCTCAAGTGGCTCGAG	65	Bradi4g30540
Bd_CESa7_R	AGGCTGGCAAATGTGCTAATCGG		
Bd_BAHD_F	GTGCTCCTCGCCCAGACTACTAAG	60	Bradi2g43520
Bd_BAHD_R	GCAAATACCCACAGAGAATCCACCG		
Bd_UBI4_F	CTGACACCATCGACAACGTGAAGG	60	Bradi3g04730

Bd_UBI4_R	AGGGTGGACTCCTTCTGGATGTTG		
Bd_GAPDH_F	TGGTGCCGATTATGTCGTGGAG		
Bd_GAPDH_R	ACCGACAACAAACATGGGAGCATC	60	Bradi3g14120

## 2.4 Análise química da parede celular

A parte aérea de plantas *B. distachyon* (folha, bainha e colmo) foi coletada após 14 dias de exposição aos tratamentos. O material foi congelado com nitrogênio líquido e posteriormente liofizados por 96 hs. O material liofilizado foi fragmentado em partes de aproximadamente 5 mm com tesoura e posteriormente triturado em moinho Mini-beadbeater em *ependorf* para obtenção do material em fragmentos menores que 60 Mesh.

### 2.4.1 Isolamento da parede celular

O isolamento da parede celular foi constituído de lavagens e centrifugações (14.000rpm) sequencias com água milliQ 70 °C por 1 h, etanol 80 °C por 4 hs, etanol 25 °C por 4 hs e acetona 54 °C por 1 h, usou-se aproximadamente 10 mg de biomassa para isolar a parede celular. Posteriormente os *sedimentos* foram submetidos a secagem sob vácuo utilizando SpeedVac (*Eppendorf*).

### 2.4.2 Determinação de celulose

Para estimar a quantidade de celulose presente na parede celular, foi utilizado o método colorimétrico segundo Van Acker *et al.* (2013). Aproximadamente 4 mg parede celular foi incubada com 1 mL TFA 2 M (ácido trifluoroacético) e 20 µL de inositol 5 M por 2 h a 99 °C à 750 rpm em *thermomix*. O extrato (sobrenadante) de TFA foi evaporado e posteriormente utilizado para determinar hemicelulose. Após incubação, a amostra foi lavada com água, seguida de duas lavagens com acetona e secagem à vácuo. Foram adicionados 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e 30 µL de fenol 5% à amostra, que foi incubada durante 1 h a 90 °C, à 500 rpm. Em seguida, foi feita a centrifugação por 3 minutos a 14.000 rpm. Uma alíquota de 50 uL foi diluída 20 vezes em

água MilliQ e quantificada em absorvância 493 nm. Uma curva padrão de glicose foi feita para a determinação dos resultados.

#### 2.4.3 Determinação de monossacarídeos da hemicelulose

Do extrato de TFA obtido da etapa inicial na determinação de celulose foi determinado os monossacarídeos arabinose, xilose e galactose. Foi realizada a derivatização alditol acetato segundo Foster *et al.* (2010a) com modificações. Para tal, ao *pellet* (formado após a secagem em *speedvac* do extrato do TFA) foi adicionado 500 µL de metanol (MeOH) e evaporado duas vezes, posteriormente adicionado Borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) 1 M (diluído em hidróxido de amônio). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1:30 h, 25 °C à 500 rpm. A reação foi neutralizada com adição gota a gota com 500 µL de ácido acético 10 % em MeOH e posteriormente evaporado. Ao sedimento formado foi adicionado 500 µL ácido acético 10 % em MeOH, agitado e evaporado por duas vezes com MeOH. À última secagem foi adicionado 100 µL de anidro acético e piridina, incubado por 20 minutos à 99 °C, 500 rpm. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 2 min 14000 rpm e evaporado em *speedvac*, ao *pellet* formado foi adicionado e evaporado por duas vezes com tolueno. Foi adicionado ao *pellet* 500 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ e 500 µL de acetato de etila e centrifugado por 5 minutos 2000 rpm, posteriormente 50 µL da fase superior formada foi transferida para *vials* e adicionado 100 µL de acetona.

Feita a derivatização as amostras foram analisadas utilizando um sistema GC-MS TruTOF GC-TOFM: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar com 30 m (DB-35, Agilent Technologies). 1 µl da amostra foi injetada no modo splitless a 230 °C carregado pelo gás hélio (fluxo contínuo) de 2 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 150° C e por 1 minuto, em seguida, aumentou-se 10°C. min<sup>-1</sup> até alcançar 245 °C, sendo essa temperatura mantida durante 5 min. Os picos foram atribuídos usando os 5 espectros deconvoluídos obtidos utilizando o software ChromaTOF (LECO). Áreas de picos cromatográficos para íons fragmentados anteriormente foram verificados e comparados com injeções de padrões analíticos puros e feita uma curva padrão. Os resultados foram expressos em µg por grama de parede celular.

#### 2.4.4 Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi determinado segundo o protocolo de Foster *et al.* (2010b) modificado. Foi utilizada amostras de parede celular isoladas (aproximadamente 3 mg). Foi adicionado 100 µL de brometo de acetila 25 % em ácido acético glacial preparado no momento de sua utilização, 4 µL de ácido perclórico 60 % foi adicionado e as amostras foram incubadas durante 30 minutos à 70 °C com agitação constante. Após a incubação e as amostras atingirem temperatura ambiente foi centrifugado por 15 minutos 14.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao *pellet* formado foi adicionado 500 µL de ácido acético, seguidamente centrifugado 3 minutos 14.000 rpm e o sobrenadante foi unido ao primeiro sobrenadante formado. Ao sobrenadantes foi adicionado 200 µL de hidróxido de sódio (2 M) e ajustado o volume para 2ml com ácido acético. As leituras foram realizadas em absorbância 280 nm. O coeficiente de extinção *Brachypodium* 18.12.

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Absorção a } 280\text{nm}}{(\text{Coeficiente} \times 0,556 \text{ cm})} \times \frac{(2\text{mL} \times 100\%)}{\text{Peso da massa seca (mg)}}$$

### 2.5 Sacarificação

#### 2.5.1 Pré-tratamento ácido

Para pré-tratamento ácido, o material seco e moído foi adicionado uma solução de ácido sulfúrico 0,5 % e submetido a uma temperatura de 99 °C por 1 h sob agitação. Posteriormente foi adicionado 500 µL de tampão acetato (25 mM, pH 4,5) ao tubo. Finalizada a etapa de pré-tratamento foi realizada 5 lavagens com tampão acetato (25 mM, pH 4,5), e ao final foi deixado um volume de 425 µL do mesmo.

#### 2.5.2 Hidrólise enzimática

A sacarificação foi realizada conforme (Gomez et al. (2011)) com modificações. Tubos de 2 mL com tampa de rosca contendo 425µL de tampão citrato (25mM, pH 4,5), a 50 °C ficou sob agitação de 450 rpm por 8 horas. A fração sólida obtida do pré-

tratamento foi utilizada como substrato. Utilizando enzima comercial (Celluclast 1.5 L, Sigma Aldrich) na concentração 15 FPU por grama de substrato. Alíquota para análise de determinação de glicose foi coletada no final da sacarificação.

### **2.5.3 Determinação de glicose**

A alíquota da sacarificação foi adicionada em tampão imidazol 50 mM pH 6,9; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; NAD<sup>+</sup> 2 mM; ATP 1 mM, contendo, 2 U.μL<sup>-1</sup> de glicose-6-fosfato desidrogenase, em volume final de 300 μL. A reação foi registrada continuamente em leitor de ELISA (ELISA Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia EUA), a 340 nm, por cerca de 5 min, sendo então acrescentado 0,2 U reação<sup>-1</sup> de hexocinase, para a determinação da glicose. O rendimento em gramas de glicose por gramas de biomassa pré-tratada utilizada ( $Y_{G/C}$ ) foi calculado ao final das 8 horas de sacarificação.

### **2.6 Determinação de fenóis solúveis totais**

A determinação do teor de fenóis solúveis totais em folha de *B. distachyon* foi realizada pelo método Folin–Ciocalteu. Em 20 mg de material liofilizado foi adicionado 200 μL de clorofórmio, 400 μL de metanol e agitado por 15 minutos. Foi adicionado mais 200 μL de clorofórmio e agitado novamente por 10 minutos. Seguidamente foi centrifugado 4.000 rpm por 5 minutos e coletado o sobrenadante, ao *pellet* formado a etapa anterior foi realizada novamente e o novo sobrenadante foi unido com o anterior formado. Neste, foi adicionado 400 μL de H<sub>2</sub>O e centrifugado por 5 minutos à 4.000 rpm. A fase superior foi coletada para quantificação. A reação para leitura foi constituída de 12 μL da amostra; 63 μL H<sub>2</sub>O; 37,5 μL Folin (1 M); 187,5 μL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 %). Posteriormente foi submetido a agitação de 1000 rpm por 40 minutos. Ao término da reação leitura realizada à 725 nm em ELISA (ELISE Versamax Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Uma curva padrão de ácido tânico foi feita para quantificação e os resultados expresso em μg por grama de matéria seca.

### **2.7 Perfil metabólico de compostos secundários e quantificação de fitohormônios**

#### **2.7.1 Extração**

Amostras de folha foram coletadas após duas semanas de tratamento e liofilizadas. A extração foi realizada a partir 20 mg do material (liofilizado) macerado em moino de bolas, foi adicionado 250 µL de metanol 80 %, agitação por vortex durante um minuto, submetido ao sonicador por 15 minutos e posteriormente centrifugado 10 minutos à 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo *ependorf*. Ao pellet resultante, repetiu-se o processo de extração e, em seguida, juntou-se os sobrenadantes. Durante a extração as amostras foram mantidas em 4 °C.

### **2.7.2 Cromatografia Líquida de ultra eficiência em tandem com espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)**

O extrato obtido foi automaticamente injetado (5 µL) no sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QQQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 2.1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1.8 µm (Agilent). A fase móvel consistiu em: (A) ácido acético 0,02 % em água e (B) ácido acético 0,02 % em acetonitrila em um gradiente de tempo %B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. Um fluxo de 0.3 ml/minuto e temperatura da coluna de 26 °C foram utilizados. No espectrometro de massas foi utilizada a fonte de ionização ESI (Electrospray Ionisation) com as seguintes condições: temperatura do gás de 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio 10 L/min, pressão do nebulizador 35 psi e de tensão capilar de 4000 V.

O equipamento foi operado no modo MRM (multiple reaction monitoring) no qual monitorou-se as massas do íon precursor/fragmento estabelecidas mediante testes de fragmentação de cada molécula: citocinina (220/136), etileno via ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC) (102,1/56,2), ABA (263/153), AIA (176/130), AS (137/93). Citocinina, ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto ABA, AIA, AS, JA no modo negativo. Uma curva de calibração (0.1 ng a 200 ng) dos respectivos padrões de cada hormônio foi feita para a obtenção da quantificação absoluta.

Para os metabólitos secundários as massas foram monitoradas com as seguintes valores: ácido cefeico (179/135), ácido ferúlico (193,05/134,1), ácido p-cumárico

(163,04/119), ácido sinápico (223/164,1) ácido siríngico (197/121,2), 4 hidróxi-3-metóxi-cinamaldeído (179,1/147,04) vanilina (151,1/92) e naringenina (273/153). Uma curva de calibração (0.03 ng a 1000 ng) utilizando os respectivos padrões de cada metabólito foi feita para a obtenção da quantificação absoluta.

Os dados de ambos compostos (hormônios e metabólitos secundários) gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” para obtenção da área dos picos. Os dados para metabólitos secundários foram expressos em µg por grama de matéria seca (µg/g), enquanto que a para hormônios em ng/g.

## **2.8 Parâmetros biométricos**

A taxa de crescimento foliar foi realizada a partir de folhas que emergiram no período de aplicação dos tratamentos. As medidas foram aferidas por régua contendo escala em mm. Para isso 4 folhas com tamanho próximo de 3 centímetros foram selecionadas para iniciar o acompanhamento do crescimento até que não fosse detectada mais diferença. Foi retirado a medida inicial e mais 5 medidas a cada 24 horas. A taxa de crescimento foi calculada usando medida após 24 horas subtraindo a medida anterior anotada.

## **2.9 Delineamento experimental e análise estatística**

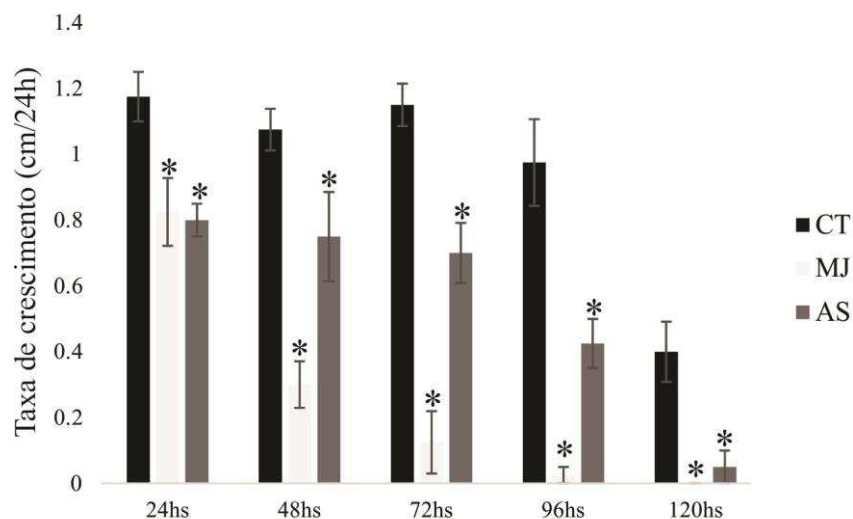
O delineamento experimental foi inteiramente casualizados (DIC), contendo três tratamentos e quatro repetições por tratamento. Foram utilizadas 5 repetições para cada tratamento (MeJA e AS). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado o teste de médias t-Student 5 % probabilidade em MS Excel.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da aplicação exógena de metil jasmonato e ácido salicílico no crescimento de plantas de *Brachypodium*

Afim de avaliar as características fenotípicas morfológicas provocadas em consequência das aplicações dos hormônios, as taxas de crescimento das folhas que se desenvolveram após a aplicação dos tratamentos de metil jasmonato (MJ) e ácido salicílico (AS) foram acompanhadas durante um período de 120 horas, sendo aferidas a cada 24 horas (Figura 2).

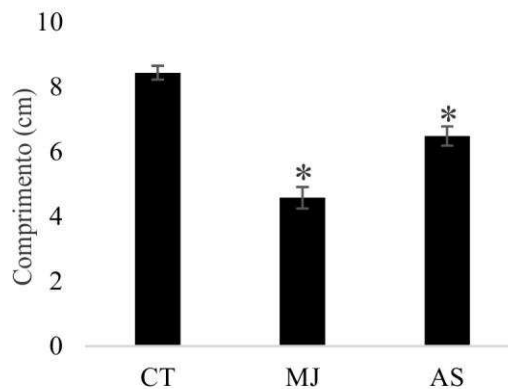
Ambos hormônios reduziram a taxa de crescimento em todos os períodos estudados. No tratamento com MJ a taxa de crescimento diminuiu em 29 % no período de 24 hs, 72 % nas 48 hs, e 89 % nas 72 hs. No período de 96 hs a taxa de crescimento foi mínima, e não teve crescimento após 120 hs. Enquanto no tratamento com AS a queda na taxa de crescimento foi menor comparada ao MJ. A taxa diminuiu em uma porcentagem similar nas 24 e 48 hs (32 % e 30 % respectivamente), nas 72 hs a diminuição da taxa foi de 39 % chegando a 56 % nas 96 horas e 87 %, nas 120 hs.



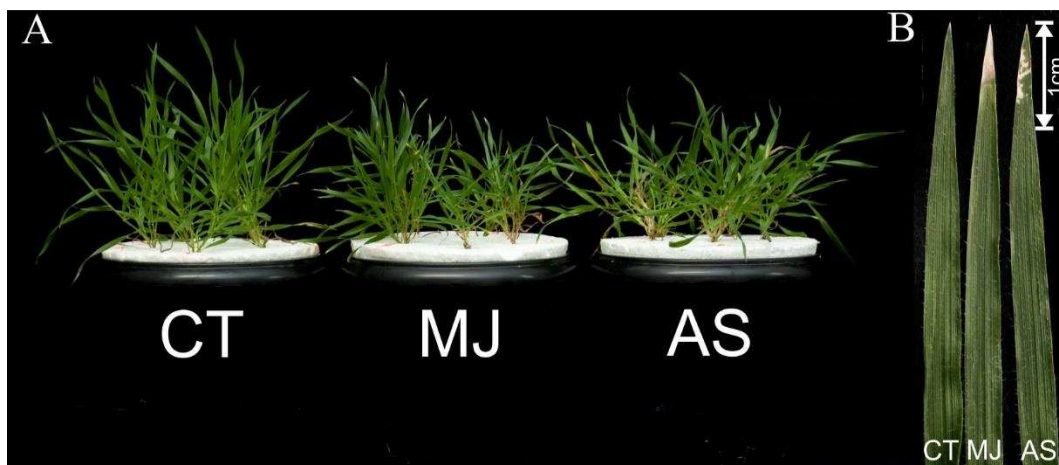
**Figura 2** – Taxa de crescimento das folhas que desenvolveram após 24, 48, 72, 96 e 120 hs da aplicação dos tratamentos de metil jasmonato e ácido salicílico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

Quando avaliamos o comprimento máximo das folhas que expandiram durante o período de exposição aos hormônios, observamos que o tratamento com MJ provocou redução de 45% em comparação com as folhas das plantas CT, enquanto que o trata-

mento com AS provocou redução de 23% (Figura 3). A imagem das plantas com o efeito dos hormônios pode ser observada na (figura 4)



**Figura 3** - Comprimento máximo da folha. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

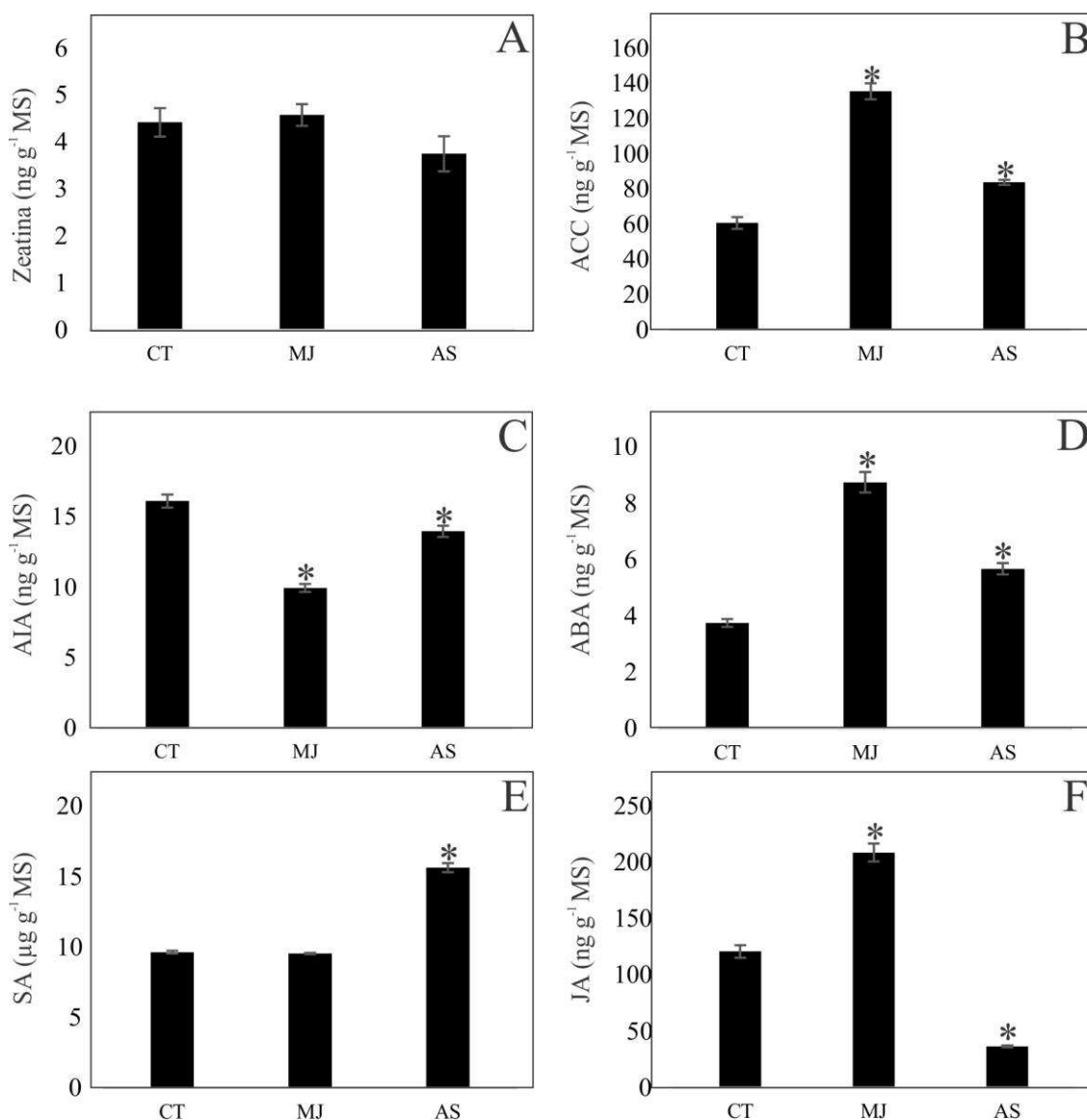


**Figura 4** – Plantas com 14 dias de tratamentos com metil jasmonato e ácido salicílico; e controle. A) Fenótipos das plantas. B) Comparações dos danos causados nas folhas após estresse. CT: controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; SA: tratamento com ácido salicílico.

### 3.2 Perfil hormonal em *B. distachyon* em resposta a aplicação exógena de MJ e AS

O perfil hormonal foi realizado em tecidos de folha que foram submetidos aos tratamentos de MJ e AS. Podemos constatar que os teores de ACC e ABA aumentaram significativamente em ambos tratamentos, sendo que com a aplicação de MJ o aumento foi de 2,2 vezes e 2,3 vezes respectivamente, enquanto no tratamento com AS o aumento foi menor (0,4 e 0,5 vezes) (Figura 5B, D). Já o teor de AIA diminuiu para ambos tratamentos, sendo que a diminuição foi maior para o tratamento com MJ (Figura 5C).

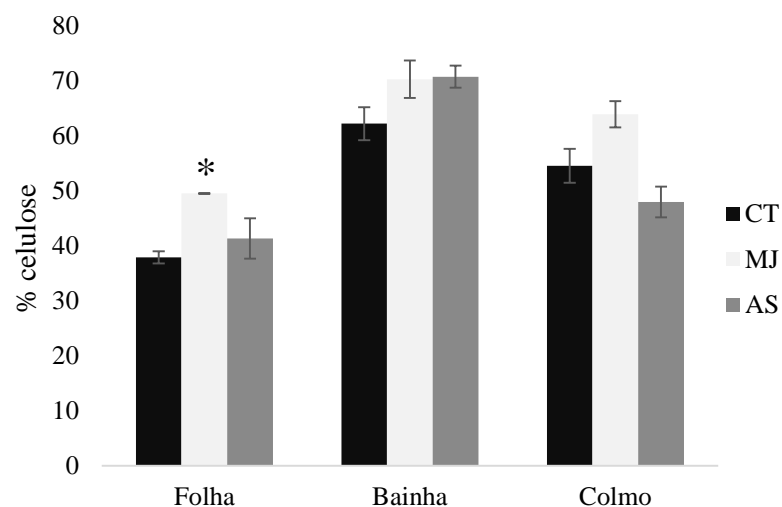
O ácido jasmônico aumentou significativamente 1,72 vezes com a aplicação exógena de MJ, e apresentou redução de 1,7 no tratamento com AS (Figura 5F). A aplicação exógena de AS aumentou a concentração de AS na folha (Figura 5E), e diminuiu a concentração de ácido jasmônico (Figura 5F), enquanto a aplicação exógena de MJ não alterou a concentração de AS. A zeatina não apresentou nenhuma alteração significativa para ambos tratamentos (Figura 5A).



**Figura 5** – Perfil hormonal em folha de plantas controle e submetidas ao tratamento de metil jasmonato e ácido salicílico. A) Zeatina. B) ACC - ácido aminociclopropano carboxílico. C) AIA - ácido indol acético. D) ABA - ácido abscísico. E) - ácido salicílico. F) JÁ - ácido jasmônico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.3 Efeito dos hormônios MJ e AS no teor de celulose da parede celular

Após a aplicação exógena dos hormônios MJ e AS por duas semanas, somente, podemos observar que apenas nas folhas das plantas tratadas com MJ foi observado um aumento significativo na porcentagem de celulose presente na parede celular, o aumento foi de aproximadamente 1,3 vezes quando comparadas com as plantas CT. Já nos demais tecidos (bainha e colmo), não houve diferença significativa para ambos hormônios (Figura 6).

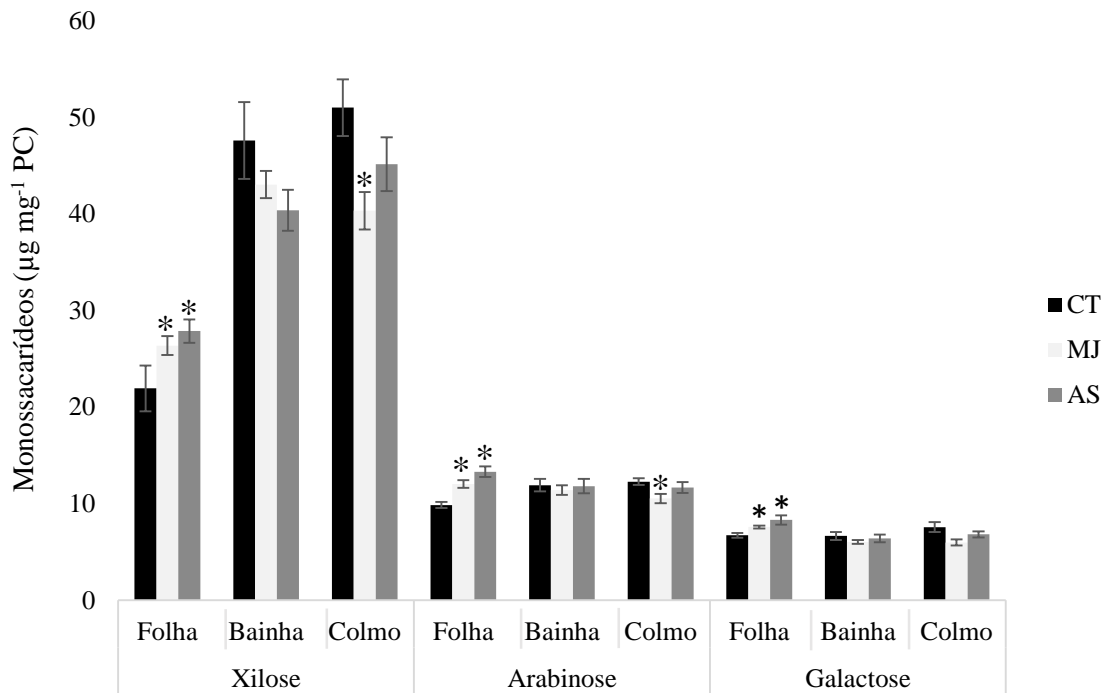


**Figura 6** - Quantificação de celulose na parede celular em diferentes órgãos, folha, bainha e colmo nas plantas controle e submetidas ao tratamento de metil jasmonato e ácido salicílico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=3). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.4 Conteúdo dos principais açúcares da hemicelulose em tecidos de folha e colmo em resposta a aplicação exógena dos hormônios e razões arabinose/celulose; parede celular/massa seca.

Alguns dos monossacarídeos (xilose, arabinose e galactose) que são constituintes da parede celular foram quantificados (figura 7). Após duas semanas de exposição ao MJ podemos observar que houve aumento significativo de 1,2; 1,22 e 1,12 vezes respectivamente na deposição destes monossacarídeos na parede celular de folha. Já nas plantas que foram expostas ao tratamento com AS os açúcares, xilose, arabinose e galactose tiveram um maior aumento, 1,27; 1,34 e 1,23 vezes, respectivamente, em comparação com as plantas CT.

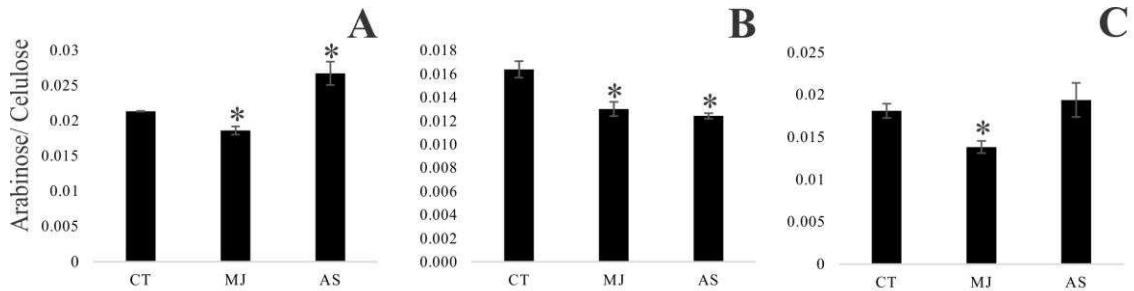
Na parede celular de colmo do tratamento com MJ os açúcares xilose e arabinose também apresentaram diferença significativa, porém houve uma redução da deposição na mesma, de aproximadamente 1,2 e 1,15 vezes respectivamente, enquanto para o tratamento com AS não houve diferenças significativas. Os açúcares, xilose, arabinose e galactose não diferiram na parede celular de bainha após duas semanas de tratamento com ambos hormônios.



**Figura 7** – Análise de carboidratos da parede celular em diferentes órgãos, folha, bainha e colmo nas plantas controle e submetidas ao tratamento de metil jasmonato e ácido salicílico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=3). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

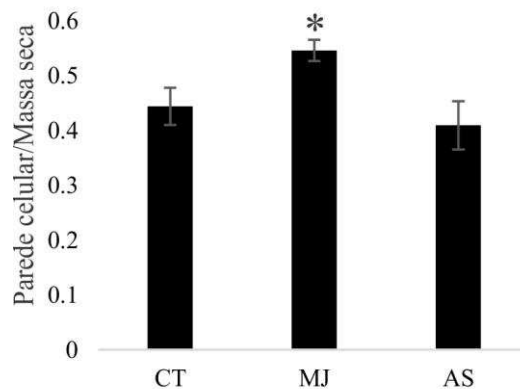
No açúcar arabinose é que são realizadas as principais ligações entre hemicelulose e lignina, através de ligações de diferulato. Quanto mais abundantes estas ligações, mais recalcitrante é a parede celular. A razão entre arabinose /celulose pode ser um indicador indireto do número de ligações diferulato possíveis de ocorrerem na parede. Observamos um efeito oposto dos dois hormônios em estudo em tecido foliar. Enquanto MJ produz uma pequena redução na razão arabinose/celulose, observamos que AS produz um aumento de 1,3 vezes nesta razão (Figura 8A).

Aplicação exógena de MJ provocou redução na razão arabinose/celulose em tecidos de bainha e colmo, em aproximadamente 1,25 vezes (figura 8 B,C). Enquanto AS provocou redução apenas em bainha em mesmas proporções (Figura 8 C).



**Figura 8** - Razão arabinose/celulose da parede celular de *B. distachyon* em diferentes órgãos. A) Razão arabinose/celulose em tecido de folha. B) Razão arabinose/celulose em tecido de bainha. C) Razão arabinose/celulose em tecido de colmo. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=3). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

Um possível indicativo para observarmos alocação de carbono para parede celular é a razão parede celular/massa seca. Observamos que esta razão aumentou em 1,22 vezes em resposta ao MJ, como na figura a baixo.

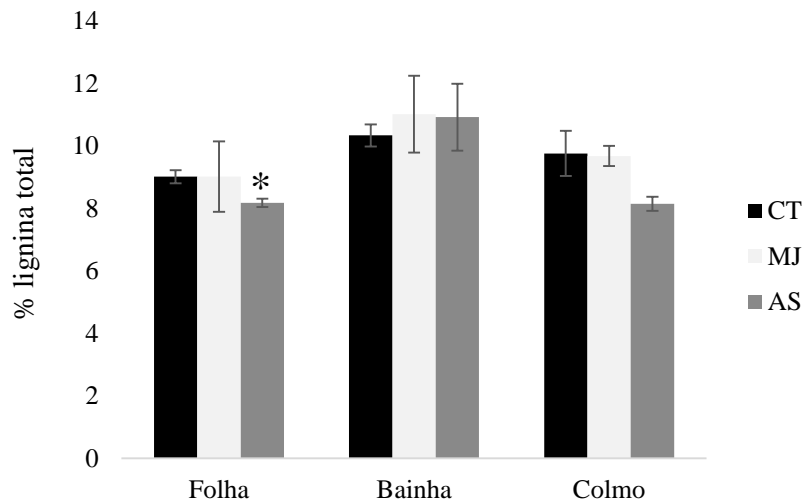


**Figura 9** - Razão parede celular/massa seca da parede celular foliar de *B. distachyon*. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=3). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.5 Efeito dos hormônios MJ e AS no teor de lignina total e razão celulose/lignina

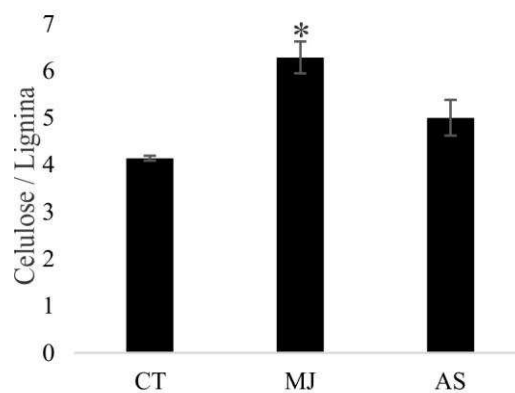
Após o período de duas semanas da aplicação do AS nas plantas, o conteúdo de lignina total na parede celular de folha apresentou um decréscimo de 10% em compara-

ção com as plantas CT, enquanto que no tratamento com MJ o conteúdo de lignina total apresentou-se em mesmas proporções que as plantas CT. Os demais tecidos em ambos tratamentos não apresentaram diferença significativa comparado as plantas CT, como visto na figura abaixo.



**Figura 10** – Quantificação de lignina total na parede celular em diferentes órgãos, folha, bainha e colmo de plantas controle e submetidas ao tratamento de metil jasmonato e ácido salicílico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

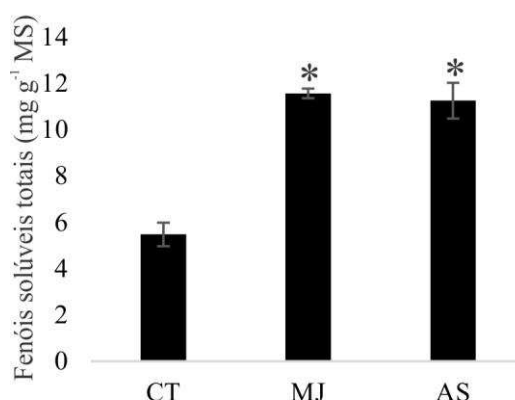
Lignina é considerado um dos principais elementos da recalcitrância da parede celular a sacarificação. A relação celulose/lignina, quando reduzida, pode sugerir uma menor recalcitrância. Observamos que somente MJ produz alterações, aumentando em 1,3 vezes a razão celulose/lignina (Figura 11).



**Figura 11** – Razão celulose/lignina da parede celular de *B. distachyon*. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=3). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.6 Efeito da aplicação de MJ e AS no teor de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi quantificado em tecidos de folha após duas semanas de tratamento. Em ambos tratamentos de MJ e AS as plantas responderam fortemente, apresentando um acréscimo significativo de 2,1 vezes e 2 vezes, respectivamente, em comparação com as plantas CT como visto na figura abaixo.



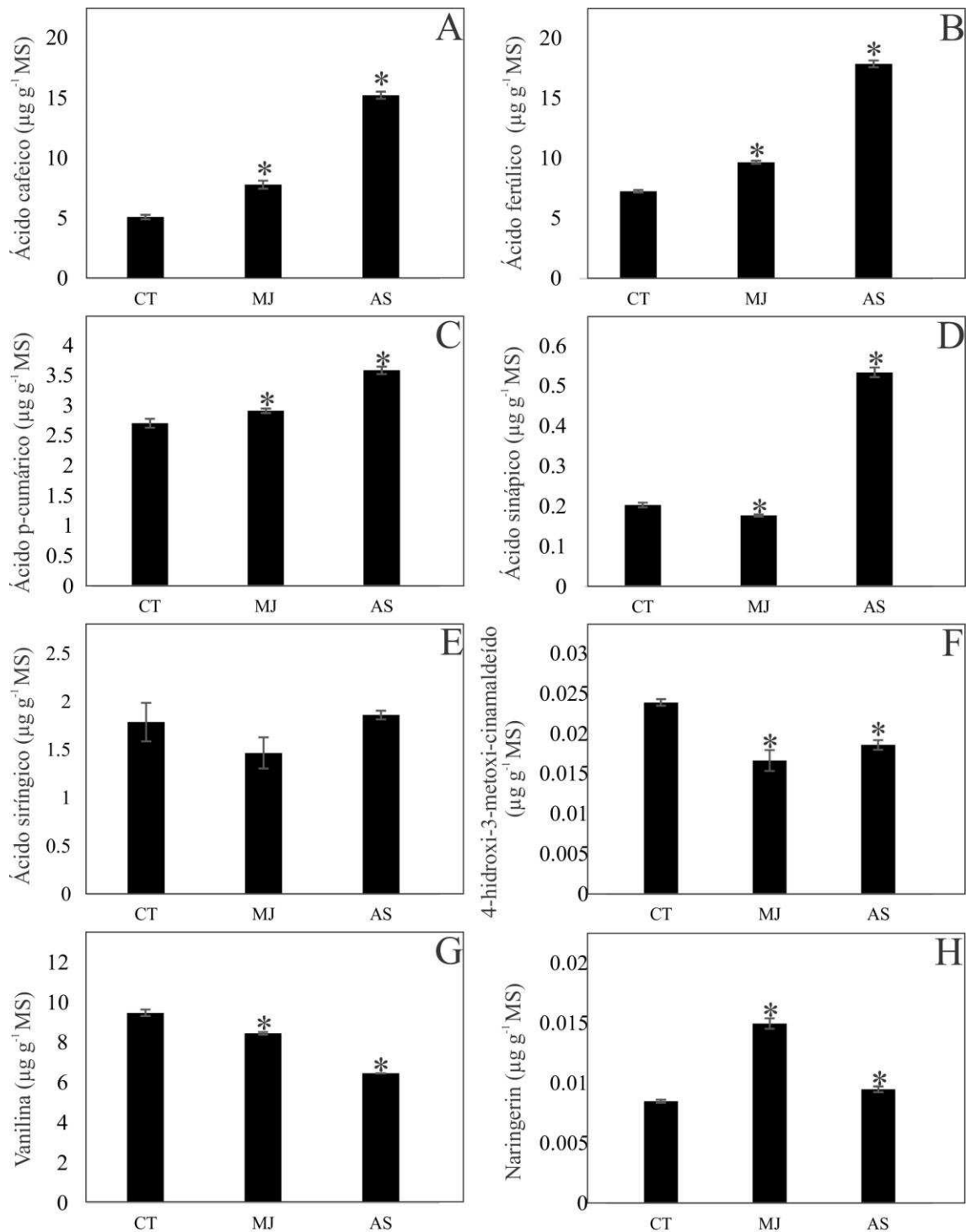
**Figura 12** – Teor de compostos fenólicos solúveis totais em folha de plantas controles e submetidas ao tratamento de metil jasmonato e ácido salicílico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.7 Alteração do perfil de metabólitos secundários em resposta a aplicação de MJ e AS

Uma avaliação mais detalhada dos compostos fenólicos foliares foi realizada para maior compreensão da dinâmica da parede celular de *B. distachyon*, uma vez que estes compostos podem influenciar fortemente na recalcitrância da parede celular na família Poaceae. Assim metabólitos secundários relacionados com a parede celular de gramíneas foram quantificados utilizando LC-MS (Figura 13).

Observamos na figura 13 A, B e C, que ambos hormônios aumentaram os teores dos ácidos cafeico, ferúlico e *p*-coumárico, sendo que maior aumento foi observado para o ácido salicílico. Enquanto o teor de ácido cafeico aumentou cerca de 3 vezes com o AS, somente um aumento de 1,5 vezes foi observado com MJ. Para o ácido ferúlico, aplicação de AS produz um aumento de 2,4 vezes, enquanto somente 1,3 vezes em resposta ao MJ (figura 13B). Da mesma forma, mas com menor diferença entre os hormônios, a aplicação de AS aumenta 1,32 vezes a concentração de ácido *p*-cumárico,

enquanto MJ aumenta somente 1,08 vezes (Figura 13C). De forma oposta ao observado a estes 3 compostos, os dois hormônios diminuem a concentração de outros compostos do metabolismo secundário. MJ e AS reduzem o teor de 4hidroxi-3metoxi cinamaldeído (30 % e 22 %, respectivamente; Figura 13 F), e vanilina (10 % e 31 %, respectivamente; Figura 13 G). Diferente também é o que observamos para naringerina, onde o MJ resulta em maior aumento deste composto (1,76 vezes), enquanto o AS aumenta somente seu teor em 10 % (Figura 13 H). Efeito oposto entre os hormônios é observado para o ácido sináptico, enquanto o AS produz um aumento de 2,6 vezes, o MJ reduz seus teores em somente 12 %. Entre os compostos analisados, o único composto que não foi afetado foi o ácido sirínico, o qual não apresentou nenhuma modificação em resposta a nenhum dos hormônios (Figura 13 E).

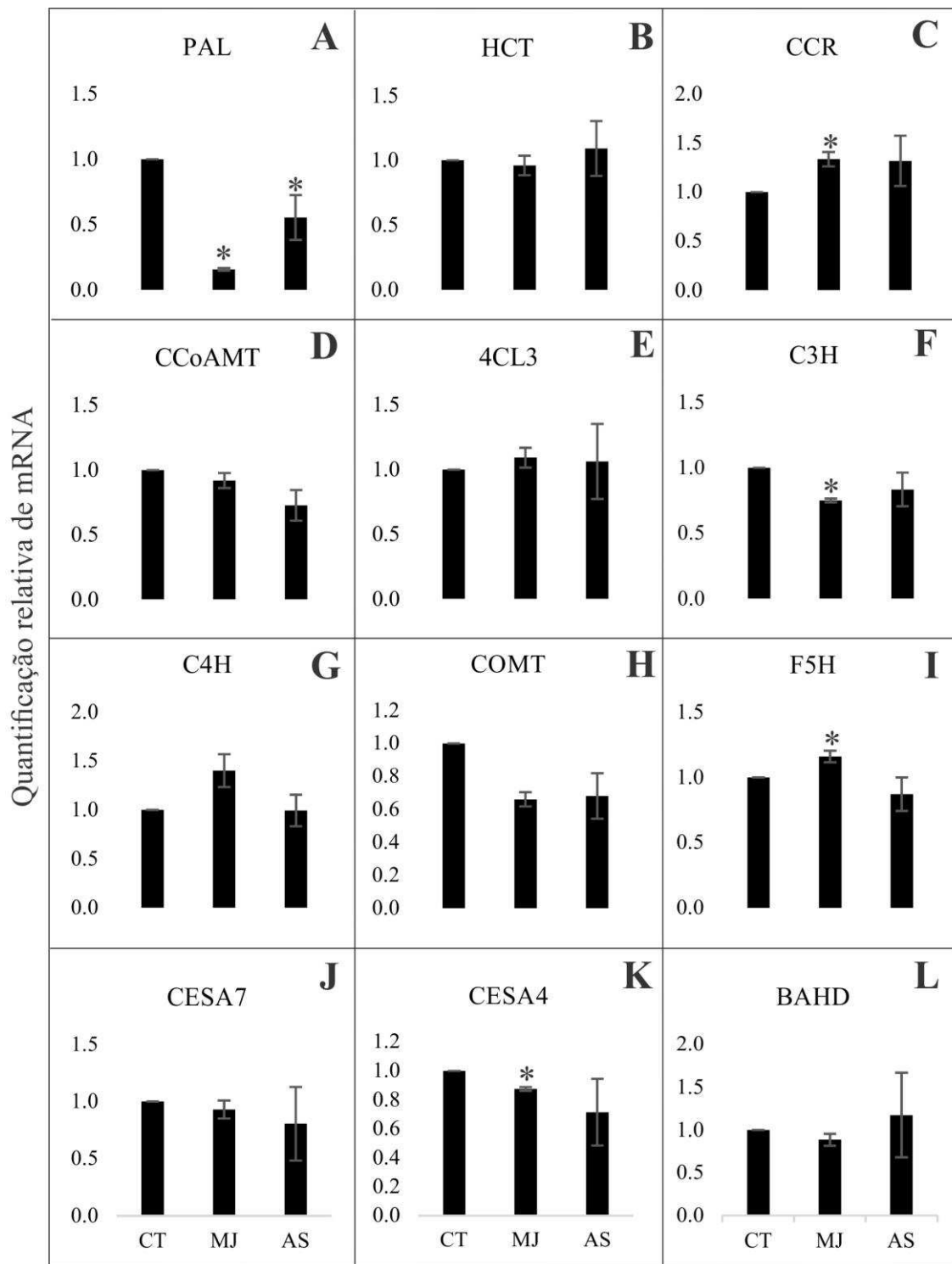


**Figura 13** – Quantificação de compostos secundários em folha de plantas controle e submetidas aos tratamentos de metil jasmonato e ácido salicílico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.8 Análise de expressão gênica

Para obtermos um panorama a nível molecular dos efeitos dos hormônios na parede celular de folha, foi realizado análises de expressão relativa de alguns genes que estão relacionados com a formação da mesma (Figura 14). Podemos observar que apenas alguns genes tiveram seu nível de expressão alterado significativamente, após duas semanas de exposição aos hormônios aplicados. Curiosamente, somente MJ afetou a expressão dos genes estudados, exceto para PAL, onde o gene também reduziu sua expressão 1,5 vezes com AS.

Apenas alguns genes apresentaram níveis relativos de expressão alterados significativamente com o tratamento de MJ. Houve aumento para os genes Cinnamoyl-CoA reductase (CCR; 1,3 vezes), Ferulate 5-hydroxylase (F5H; 1,2 vezes) (Figura 14 C, I). Por outro lado, MJ reduziu a expressão dos genes Phenylalanine ammonia lyase (PAL; 1,85 vezes), p-coumarate 3-hydroxylase (C3H; 1,25 vezes), Caffeic acid O-methyltransferase (COMT; 1,34), cellulose synthase (CESA4; 1,12 vezes) tiveram sua expressão reduzida, (Figura 14 A, F, H, K).

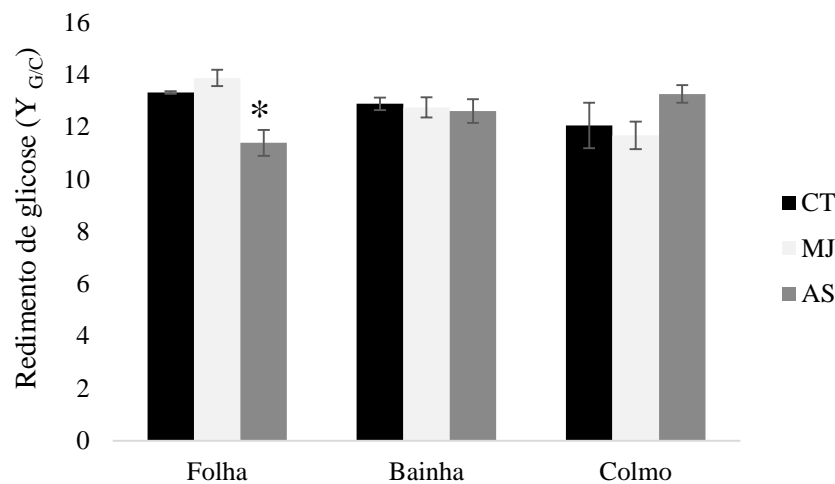


**Figura 14** – Análise de expressão gênica em folha após quatorze dias de exposição aos tratamentos **A)** PAL: Fenilalanina amônia-liase (Bradi3g49250). **B)** HCT: Hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferase (Bradi3g48530). **C)** CCR: Cinamoil-CoA redutase (Bradi3g54950). **D)** CCoAMT: cafeoil-CoA o-metiltransferase (Bradi1g48370). **E)** 4CL3: 4-cumarato coenzima A ligase (Bradi3g05750). **F)** C3H: – *p*-cumarato 3-hidrolase (Bradi2g21300). **G)** C4H: Trans-cinamato 4-hidrolase (Bradi2g31510). **H)** COMT: ácido caféico O-metiltransferase (Bradi3g16530). **I)** F5H: Ferulato-5-hidroxilase (Bradi3g30590). **J)** CeSA7: Celulose sintase (Bradi4g30540). **K)** CeSA4: celulose sintase (Bradi3g28350). **L)** BAHD: Acetiltransferase (Bradi2g43520). Nível relativo da expressão gênica normalizada em

relação ao nível de expressão dos genes constitutivos. Médias representam n=3. (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

### 3.9 Efeito da aplicação exógena de hormônios na sacarificação da parede celular.

O rendimento de glicose ( $Y_{G/C}$ ) das folhas tratadas com ácido salicílico após 8 horas de sacarificação apresentaram uma redução significativa no rendimento da sacarificação em aproximadamente 15%. Nos tecidos de bainha e colmo dos tratamentos com os hormônios MJ e AS não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. (Figura 15).



**Figura 15** - Porcentagem de liberação de açúcar após 8 horas de sacarificação com biomassa pré-tratada à 0,5%  $H_2SO_4$ . Diferentes órgãos, folha, bainha e colmo submetidos ao tratamento de metil jasmonato e ácido salicílico foram utilizados como biomassa. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão (n=4). (\*) indica diferença significativa entre médias em relação ao controle do mesmo órgão pelo teste t-Student ( $p < 0,05$ ). CT: Controle; MJ: tratamento com metil jasmonato; AS: tratamento com ácido salicílico.

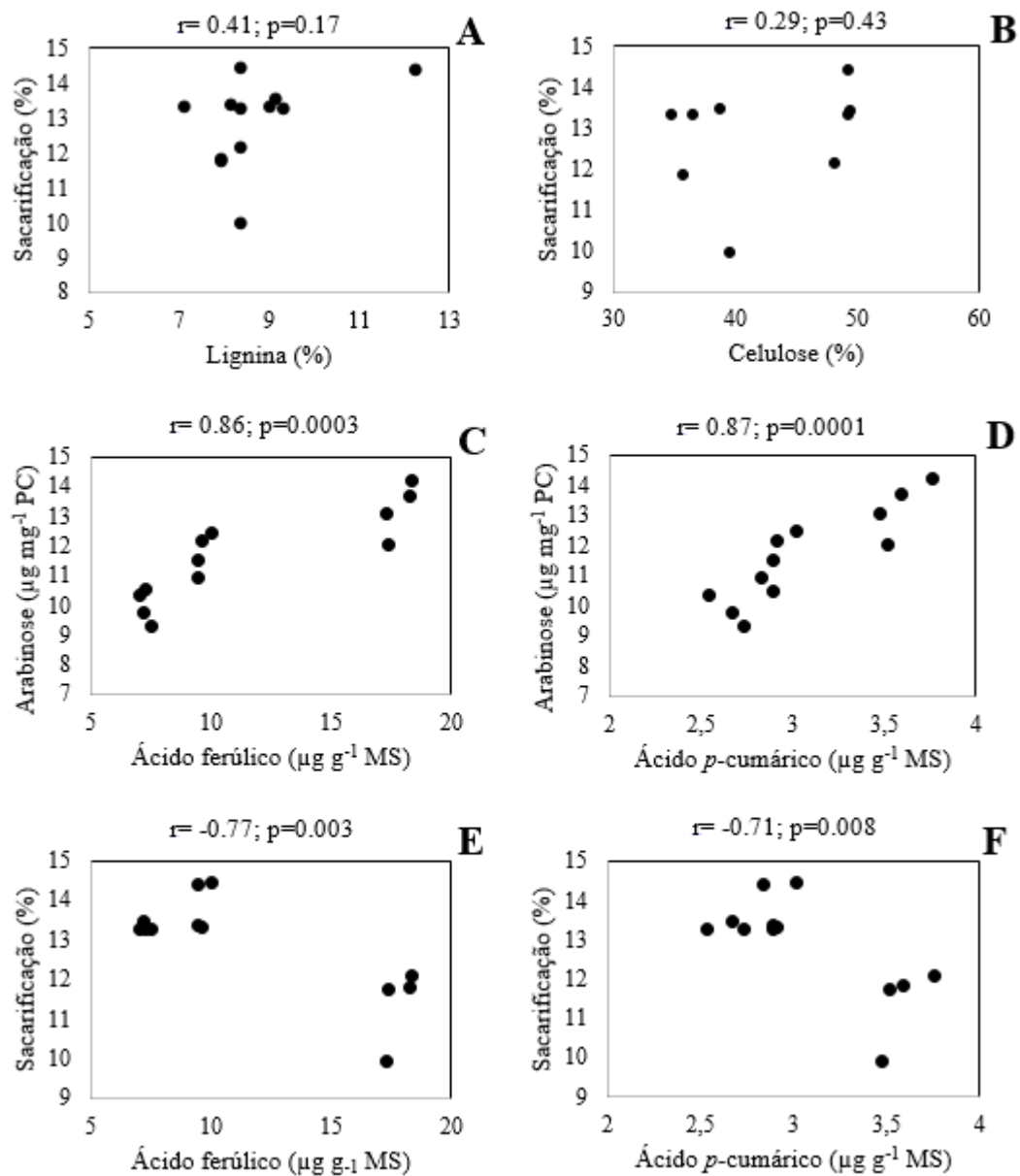
### 3.10 Correlações entre composição da parede celular e eficiência da sacarificação

A lignina tem sido considerada como o principal fator da recalcitrância da parede celular. O estudo da correlação entre os dois neste estudo, mostrado na figura 16 A, indica que não houve correlação significativa entre lignina e sacarificação. Quando analisamos a correlação entre celulose (principal fonte de açúcar para fermentação) e

sacarificação, não observamos correlação significativa entre estas duas variáveis figura 16 B.

Ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico são intermediários entre as ligações cruzadas entre a arabinose da hemicelulose e a lignina, na parede celular. Como houve alteração no teor de arabinose, um dos açúcares da hemicelulose, e também alterações no teor de ácido ferúlico e *p*-CA em resposta aos fitohormônios exógenos em tecido foliar, analisamos a correlação entre os açúcares e estes fenilpropanóides. Observamos que os teores de ácido ferúlico e *p*-CA são altamente correlacionados, positivamente, com o teor de arabinose como mostrado na figura 16 C,D.

As alterações do conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos na parede celular de monocotiledôneas pode alterar sua recalcitrância. Mostrado na figura 16 E F, podemos observar alta correlação negativa entre estes compostos e a sacarificação em parede celular de folha de *B. distachyon*.



**Figura 16** – Correlação de Pearson entre sacarificação/ácido hidroxicinâmicos e entre componentes da parede. A) Correlação entre sacarificação e lignina. B) Correlação entre sacarificação e celulose. C) Correlação entre arabinose e ácido ferúlico. D) Correlação entre arabinose e ácido *p*-cumárico. E) Correlação entre sacarificação e ácido ferúlico. F) Correlação entre sacarificação e ácido *p*-cumárico.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Aplicações exógenas de MJ e AS reduzem o crescimento em *Brachypodium*

Estes dois hormônios são sinalizadores para as plantas da existência de um estresse biótico. Enquanto ambos têm seus teores aumentados após infecções de determinados fungos, outros acarretam em mudanças específicas, por exemplo, ataque de patógenos biotróficos o AS tem efeito mais pronunciado, enquanto do ataque de patógenos necrotróficos o AJ tem seu efeito destacado (Glazebrook, 2005; Smith *et al.*, 2009).

Os tratamentos com metil jasmonato (MJ) e ácido salicílico (AS) em *B. distachyon* alteraram o fenótipo morfológico em plantas em estágio juvenil. Foi observado redução de taxa no alongamento foliar em ambos casos, assim como o tamanho máximo da folha. Kovacik *et al.* (2009) demonstrou em *Matricaria chamomilla* que a dose de 250  $\mu\text{M}$  atuou como inibidor do crescimento, pelo aumento de compostos fenólicos solúveis e estresse oxidativo. Já é conhecido o efeito do MJ em inibir o crescimento das plantas (Yamane *et al.*, 1980; Dathe *et al.*, 1981; Ueda & Kato, 1982; Tian *et al.*, 2014). Em *Arabidopsis* MJ exógeno provocou redução do crescimento foliar, estando relacionado com redução em tamanho e número de células (Zhang & Turner, 2008; Noir *et al.*, 2013). Este efeito em inibir o crescimento faria sentido como uma maneira de mudar a alocação do carbono, permitindo assim que mais carbono fosse direcionado para defesa da planta. Já outros reportam que a aplicação exógena de AS (1 e 2 mM) aumenta o peso seco total e também de brotos e raízes em *C. officinalis* (Bayat *et al.*, 2012). Em nosso estudo as aplicações exógenas de MJ e AS em 0,1 mM foram capazes de reduzir o crescimento, sendo para MJ um efeito ainda superior.

Acredita-se que uma defesa eficaz requer quantidades significativas de esqueletos de carbono para síntese de metabólitos secundários, assim, minimizando disponibilidade de carbono e energia para processos de crescimento (Karabourniotis *et al.*, 2014). Desta maneira, geralmente redução do crescimento está acompanhado do alto investimento em defesa (Herms & Mattson, 1992).

### 4.2 Aplicação exógena de MJ e AS altera a concentração de vários hormônios

A aplicação exógena foi efetiva em aumentar a concentração de ambos hormônios aplicados e a aplicação de AS reduziu o teor de JA. Mais importante, a redução dos níveis de AIA em ambos tratamentos pode estar relacionada com a baixa taxa do alongamento foliar, uma vez que a auxina está ligada com a expansão celular e a divisão celular. O efeito do MJ em reduzir o crescimento por afetar a síntese de auxina já foi relatado (Naseem *et al.*, 2015). O efeito do AS em aumentar o ABA, como demonstrado aqui, tem sido controverso, mas pode ser, ao menos parcialmente, devido a diferenças na dose utilizada (Horvath *et al.*, 2015).

Metil jasmonato e ácido salicílico exógenos têm demonstrado alterar fortemente na expressão de genes relacionados a defesa contra estresses bióticos, de forma que o controle na rede de sinalização entre eles é crucial para uma resposta final eficiente. Ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno estão intimamente relacionados a estas respostas e apresentam alta complexidade, sinergia e antagonismo entre eles (Bari & Jones, 2009; De Vleeschauwer *et al.*, 2013). Podemos observar interação sinérgica do MJ com o ET em folhas de *B. distachyon*, tal interação na sinalização entre estes hormônios para ativação da expressão de genes relacionados a defesa muito é estudado, dada sua complexidade e importância (Thomma *et al.*, 2001; Kunkel & Brooks, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003). Como também, mas de forma antagônica, ácido salicílico e ácido jasmônico (Kunkel & Brooks, 2002; Glazebrook *et al.*, 2003).

Em tomate aplicação exógena de AS tem sido demonstrado em inibir síntese de JA (Zavala & Baldwin, 2006; Thaler *et al.*, 2010). A resposta do AS exógeno em cultura de células em suspensão de pêra provocou redução na síntese de etileno (Leslie & Romani, 1986). Em *Arabidopsis* foi detectado aumento de etileno em plantas tratadas com 1 mM de AS (Rao *et al.*, 2002). Em *B. distachyon* muito pouco têm-se estudado às alterações hormonais, assim, sendo necessário estudos do controle do balanço hormonal nesta espécie modelo visando a dinâmica da parede celular.

#### **4.3 MJ e AS alteram a composição da parede celular**

Somente o MJ foi capaz de aumentar o teor de celulose em folhas. Poucas evidências são relatadas na literatura sobre a influência do MJ na síntese de celulose. Recentemente Li *et al.* (2015) mostrou que o gene *ppa0011941m*, que codifica uma celu-

lose sintase, foi regulado positivamente com o tratamento com MJ em pêssego. Embora o teor de hemicelulose não tenha sido medido, determinamos a concentração de açúcares que compõem principalmente este importante polissacarídeo da parede celular. O fato que ambos os hormônios tenham sido capazes de aumentar os teores de xilose, arabinose e galactose, sugere um aumento no teor de hemicelulose nestas plantas. Em segmentos de coleótilos de Aveia incubados por 4 horas em 10  $\mu$ M de AJ não alterou os teores dos monossacarídeos da hemicelulose (Ueda *et al.*, 1995). Embora o aumento de arabinose em folhas tenha sido semelhante em resposta a ambos hormônios, somente AS aumentou a razão arabinose/celulose, MJ apresentou um pouco reduzido esta razão, deve-se ao fato do aumento do conteúdo de celulose. Esta razão pode estar ligada ao grau de ligação entre celulose e hemicelulose, pois é através da arabinose que se formam as ligações diferulato que ligam a hemicelulose a celulose. A hemicelulose forma uma capa sobre a celulose, e quando mais forte for a ligação entre ambas, maior a recalcitrância (Siqueira *et al.*, 2011).

Somente o AS afetou o teor de lignina total, reduzindo-a somente em folhas. Há uma forte evidência dos níveis intracelulares de AS influenciar no teor de lignina, pois em alfafa foi visto forte correlação negativa entre estas variáveis em linhas transgênicas reguladas negativamente para lignina (Lee *et al.*, 2011). Só o MJ aumentou a razão celulose/lignina em folhas, e isto pode ser devido ao aumento da celulose causado por este hormônio, visto que não alterou a lignina. Este resultado reforça o fato de que este hormônio realmente afeta o teor de celulose em folhas. O maior valor desta razão tem sido associado com a menor recalcitrância (Pauly & Keegstra, 2010). Visto que haveria maior disponibilidade de açúcares para os processos de sacarificação de fermentação, seja pelo aumento no conteúdo celulose, ou pela redução no conteúdo de lignina. Em alfafa a recalcitrância da sacarificação enzimática com pré-tratamento ácido foi diretamente proporcional a concentração da lignina, sendo que em alguns transgênicos a liberação de açúcar chegou a aumentar em quase 2 vezes (Chen & Dixon, 2007).

Outro efeito importante na parede foi o efeito exclusivo do MJ em aumentar a relação parede celular/massa seca. O fortalecimento da parede celular é uma resposta de defesa das plantas (Malinovsky *et al.*, 2014). Em milho, observou-se que um dos principais mecanismos de defesa contra “broca do milho” foram as alterações nos principais componentes da parede celular, incluindo, composição dos polissacarídeos, teor/composição de lignina e ácidos hidroxicinâmico. Coletivamente tais alterações cul-

minaram em aumento no conteúdo total de parede celular e relação a massa seca (Barros-Rios et al., 2011). Entretanto, embora tenha sido reportado que o aumento em AS seja um sinal importante para este fortalecimento da parede, na dose utilizada neste trabalho, não observamos efeito do AS na relação parede celular/massa seca.

#### **4.4 MJ e AS afetam marcadamente o metabolismo secundário em *Brachypodium* e não pode ser explicado por alterações na expressão genica.**

A importância do MJ e AS na regulação da resposta das plantas a estresses bióticos e em regular o metabolismo secundário pode ser confirmada em função do seu efeito comum em aumentar mais que duas vezes o teor de fenólicos solúveis. Estes compostos são induzidos normalmente na presença de patógenos, e inclui uma ampla variedade de compostos fenólicos e derivados de fenóis, lignina solúvel, fenilpropanóides, flavonoides, fitoalexinas, terpenóides, entre outros (Karabourniotis *et al.*, 2014).

Entre a maioria dos metabólitos que tiveram aumento com a aplicação dos hormônios, como os ácidos cafeico, ferúlico (FA), *p*-cumárico (*p*-CA), sinápico, e da fitoalexina, observamos que maiores aumentos foram produzidos pela aplicação de AS, em comparação com MJ. A presença de ácido ferúlico e cumárico produz significantes reduções no crescimento de *Fusarium* (McKeehen et al., 1999). Ponts et al. (2011) demonstraram que não apenas FA e *p*-CA, mas também os ácidos cafeico e siríngico desempenham funções na inibição de crescimento em *Fusarium graminearum*, assim como ácido sinápico reduziu produção de aflatoxina em *Aspergillus* ssp (Hua *et al.*, 1999). Em nosso estudo os níveis de naringenina (fitoalexina) também apresentaram aumento em ambos tratamento, sendo este um composto que pode inibir o crescimento de ambos os agentes patogênicos, bacterianos e fúngicos (Padmavati *et al.*, 1997). A pequena redução no teor de vanilina, que também tem uma ação antimicrobiana, pode ser sugerida como devida ao aumento de seus intermediários, como ácido cafeico, cumárico e ferúlico. Neste caso, ao invés de serem usados em parte para a síntese vanilina, foram mais incorporados na parede, como hipostenizamos neste trabalho.

Outra consequência deste aumento citado, em particular ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico podem explicar a diminuição na taxa de alongamento foliar. Como visto por MacAdam and Grabber (2002) o alongamento da folha de *Festuca arundinacea* foi

reduzido com a deposição de FA na parede celular. Assim, argumenta-se que as ligações cruzadas dos ácidos hidroxicinâmico entre polissacarídeos da parede celular representam considerável importância no controle da expansão celular (de O. Buanafina, 2009).

O aumento dos compostos citados contrasta com a forte redução na expressão da isoforma de PAL estudada neste trabalho. Várias isoformas desta enzima existem em plantas, e elas podem ter diferentes funções, como síntese de lignina, ou síntese de compostos de defesa (Huang *et al.*, 2010). A maior redução em PAL em AS (cerca de 1,85 vezes) foi associada com uma pequena redução em lignina, somente para este hormônio, ao passo que a redução em 1,5 vezes desta, em resposta ao MJ, não resultou em alteração no teor de lignina. Nossa hipótese seria de que esta isoforma estaria relacionada a síntese de lignina, mas que somente reduções mais drásticas do acumulado de mRNA para esta enzima é que levaria a uma redução no teor de sua enzima, de forma suficiente a promover uma redução no fluxo de síntese de lignina. Entretanto, para este mesmo gene *PAL* em estudo (Bradi3g49250), Coss et al (2015) sugeriram que expressão do gene assim como sua atividade enzimática estão correlacionados, onde a diminuição da expressão do gene bradi3g49250 (BdPAL RNAi1-1) resultou em diminuição no acúmulo de FA e *p*-CA. Em nosso estudo o gene Bradi3g49250 mostrou uma inversa relação, o que pode ser explicado pela baixa expressão deste gene em tecido foliar como também demonstrados por estes autores. Isso nos mostra a complexidade para compreensão de como genes relacionados fenilpropanóides respondem a diferentes estímulos em diferentes tecidos.

Das outras onze enzimas estudadas, 7 delas não foram afetadas por ambos hormônios, apesar das marcantes alterações no metabolismo. Somente o MJ afetou as 4 outras enzimas estudadas, reduzindo a expressão de 2 delas (C3H eCESA4), e aumentando a expressão de outras duas (CCR e F5H). Excetuando-se PAL, as alterações em todas elas foram menores do que 50%. O aumento específico de celulose em resposta ao MJ, não foi refletido na ausência do efeito na expressão da sintase da celulose CESA7, e na redução da outra CESA4. Várias isoformas de síntese da celulose existem, mas diferenças nas funções das mesmas ainda são pouco conhecidas (Somerville, 2006). Nossa hipótese seria a de que a mudança na alocação de carbono possa ser devida a mudança de fluxos associados a alguma forma de alteração do controle alostérico de algumas das enzimas de sua síntese. Em resumo, não podemos encontrar alguma

ligação entre as alterações na expressão gênica que possa explicar as modificações na concentração dos metabólitos secundários.

#### **4.5 Aumento da recalcitrância em resposta ao SA não é explicada por alterações no teor de lignina e celulose**

A recalcitrância da parede celular é o principal entrave para o maior aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Interessantemente, encontramos reduções significativas na sacarificação em tecido de folha (redução no rendimento de glicose) em resposta à aplicação do hormônio ácido salicílico.

Vários estudos em plantas transgênicas ou mutantes de diferentes espécies mostraram que a redução no teor de lignina está diretamente acompanhado pela maior liberação de açúcar após a sacarificação (maior digestibilidade) (Chen & Dixon, 2007; Li *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2014). Porém, na maioria dos casos não foram analisados outros metabólitos que podem afetar a recalcitrância, como os compostos fenólicos. Curiosamente, nossos resultados mostraram que o teor de lignina total foi reduzido nas plantas tratadas com AS em relação as plantas controle e o conteúdo de celulose não foi alterado, entretanto, o rendimento na liberação de glicose diminuiu. Estes resultados podem ser explicados com o aumento na síntese de compostos fenólicos, em particular, o aumento de *p*-CA e FA (aumento de aproximadamente 33% e 150% respectivamente) afetando a recalcitrância. De fato, houve uma correlação negativa alta e significativa entre FA/Sacarificação ( $r = -0,77$ ) e *p*-CA/sacarificação ( $r = -0,71$ ). Como em outras espécies, a redução no conteúdo de lignina também resultou no aumento de fenóis solúveis (van der Rest *et al.*, 2006). Como estes fenilpropanóides, são precursores dos monolignóis H, G e S, e tem forte ação antimicrobiana, é plausível sugerir que uma pequena redução na síntese de lignina, em geral, seja necessária para aumentar a concentração destes importantes compostos de defesa.

Embora o efeito negativo destes metabólitos secundários na sacarificação não seja sem precedentes (de O. Buanafina, 2009), sua importância relativa tem sido negligenciada devido ao efeito negativo claro da lignina, e poucos trabalhos estudando sua importância relativa. Recentemente Penning *et al.* (2014) analisando QTLs em uma população de milho durante vários anos, demonstrou a natureza poligênica da recalcitrância, e

mostrou que outros fatores, ao lado da lignina, tem também importância fundamental na recalcitrância. A análise de uma população de mutantes em *B. distachyon* mostrou que a alta eficiência na sacarificação está associada a outros compostos da parede celular, e não foram correlacionados com a lignina (Marriott *et al.*, 2014).

O FA e *p*-CA podem formar ligações cruzadas entre polissacarídeos não celulósico (hemicelulose) via ligação éster, assim como entre hemicelulose e lignina via ligação éter com resíduos de arabinose que estão presentes nas cadeias laterais de glucuronoarabinosilano (GAX), uma das frações presentes na hemicelulose (de O. Buanafina, 2009).

Concomitantemente com o aumento de FA e *p*-CA encontramos aumento nos principais monossacarídeos constituintes das hemiceluloses na parede celular, em particular arabinose, onde encontramos uma forte correlação positiva com estes compostos, ( $r = 0,86$  e  $r = 0,87$ , respectivamente). Rancour *et al.* (2015) demonstram através de mutantes BdRGP1 que a redução de arabinose resulta em diminuição na incorporação de hidroxicinamatos ligados a parede celular. Assim, possivelmente o aumento da disponibilidade de cadeias laterais de arabinose foi um fator importante para suportar maiores quantidade de ligações cruzadas na parede celular com FA e *p*-CA resultando em aumento da recalcitrância.

Outro resultado interessante foi o tratamento com MJ, que embora efeitos similares nas alterações nos compostos fenólicos totais, ácidos hidroxicinâmicos (FA e *p*-CA) e hemicelulose foram notados em folha, o rendimento de glicose na sacarificação não apresentou diferença em relação ao controle. Por outro lado, o conteúdo de celulose aumentou, sendo este o principal componente da parede celular para conversão em açúcares fermentáveis (Pauly & Keegstra, 2010). E considerando a maior razão celulose/lignina acompanhado de inalteração no conteúdo de lignina, podemos sugerir que estes efeitos do MJ contrapõem o aumento dos compostos secundários, de forma que não houve então alteração da recalcitrância.

Um fator a ser considerado são os fitohormônios que pouco, ou nunca, desencadeiam respostas isoladamente, os balanços endógenos dos demais fitohormônios colaboram para a resposta final. A parede celular vegetal contribui para uma característica única das plantas que são fundamentais durante o desenvolvimento e nas respostas adaptativas a condições adversas (Didi *et al.*, 2015).

## CONCLUSÕES

A aplicação dos hormônios metil jasmonato e ácido salicílico reduziram o alongamento foliar, o qual parece estar ligado ao efeito combinado da inibição da elongação celular e divisão celular associados com o aumento do ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, com a redução no teor de AIA, e com o aumento do teor de ABA.

Outro aspecto importante é o efeito claro destes hormônios na parede celular das folhas, exclusivamente, como o aumento da celulose (MJ), xilose, arabinose e galactose (ambos), aumento da razão arabinose/celulose (AS), e parede celular/massa seca total (MJ), e redução do teor de lignina (AS). Estas alterações foram relacionadas a vários efeitos no metabolismo secundário, como aumento dos fenóis totais, ácido cafeico, ferúlico (FA) e *p*-cumárico (*p*-CA) e naringerina (todos para ambos hormônios), e ácido sinápico (somente AS). Estas alterações são explicadas por alterações de 12 genes desta rota estudados neste trabalho.

Como consequência conjunta desta alteração na parede e no metabolismo secundário podemos detectar uma redução em 15% na eficiência da sacarificação enzimática somente para AS. Este efeito é fortemente correlacionado negativamente com o aumento de FA e *p*-CA, e com o aumento do teor de arabinose da parede, ao passo que não correlacionou-se com as alterações no teor de lignina. Estes dados mostram que compostos secundários podem afetar a recalcitrância e superar o efeito de alterações na lignina em *B. distachyon*.

As gramíneas são as principais fontes para alimentação humana e atualmente tem sido também utilizada para produção de biocombustíveis. *B. distachyon* apresenta-se como modelo de estudo para este grupo, e ainda é necessário se explorar em profundidade nesta espécie para compreendermos a dinâmica da parede celular em monocotiledôneas e assim projetarmos tais conhecimentos para demais culturas.

## 5. REFERÊNCIAS

- BARI, R. & JONES, J. D. (2009). **Role of plant hormones in plant defence responses.** *Plant molecular biology* 69, 473-488.
- BARROS-RIOS, J., MALVAR, R. A., JUNG, H.-J. G. & SANTIAGO, R. (2011). **Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers.** *Phytochemistry* 72, 365-371.
- BAYAT, H., ALIREZAI NOGHONDAR, M. & NEAMATI, S. H. (2012). **Impact of exogenous salicylic acid on growth and ornamental characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress.** *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.*
- BEVAN, M. W., GARVIN, D. F. & VOGEL, J. P. (2010). **Brachypodium distachyon genomics for sustainable food and fuel production.** *Current opinion in biotechnology* 21, 211-217.
- BOERJAN, W., RALPH, J. & BAUCHER, M. (2003). **Lignin biosynthesis.** *Annual review of plant biology* 54, 519-546.
- BONAWITZ, N. D. & CHAPPLE, C. (2013). **Can genetic engineering of lignin deposition be accomplished without an unacceptable yield penalty?** *Current opinion in biotechnology* 24, 336-343.
- BOUVIER D'YVOIRE, M., BOUCHABKE-COUSSA, O., VOOREND, W. & other authors (2013). **Disrupting the cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 gene (*BdCAD1*) leads to altered lignification and improved saccharification in *Brachypodium distachyon*.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 73, 496 - 508.
- BRKLJACIC, J., GROTEWOLD, E., SCHOLL, R. & other authors (2011). **Brachypodium as a model for the grasses: today and the future.** *Plant physiology* 157, 3-13.
- CAMARGO, E., NASCIMENTO, L., SOLER, M. & other authors (2014). **Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*.** *BMC plant biology* 14, 256.
- CASS, C. L., PERALDI, A., DOWD, P. F. & other authors (2015). **Effects of PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*.** *Journal of experimental botany.*
- CHEN, F. & DIXON, R. A. (2007). **Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production.** *Nat Biotechnol* 25, 759-761.

CUI, T., LI, J., YAN, Z., YU, M. & LI, S. (2014). **The correlation between the enzymatic saccharification and the multidimensional structure of cellulose changed by different pretreatments.** *Biotechnology for biofuels* 7, 134.

DATHE, W., RÖNSCH, H., PREISS, A., SCHADE, W., SEMBDNER, G. & SCHREIBER, K. (1981). **Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp.** *Planta* 153, 530-535.

DE JONG, F., HANLEY, S. J., BEALE, M. H. & KARP, A. (2015). **Characterisation of the willow phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene family reveals expression differences compared with poplar.** *Phytochemistry* 117, 90-97.

DE O. BUANAFINA, M. M. (2009). **Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives.** *Molecular plant* 2, 861-872.

DE VLEESSCHAUWER, D., GHEYSEN, G. & HOFTE, M. (2013). **Hormone defense networking in rice: tales from a different world.** *Trends in plant science* 18, 555-565.

DIDI, V., JACKSON, P. & HEJATKO, J. (2015). **Hormonal regulation of secondary cell wall formation.** *Journal of experimental botany*.

DRAPER, J., MUR, L. A., JENKINS, G., GHOSH-BISWAS, G. C., BABLAK, P., HASTEROK, R. & ROUTLEDGE, A. P. (2001). **Brachypodium distachyon. A new model system for functional genomics in grasses.** *Plant physiology* 127, 1539-1555.

EUDES, A., LIANG, Y., MITRA, P. & LOQUÉ, D. (2014). **Lignin bioengineering.** *Current opinion in biotechnology* 26, 189-198.

FERNANDES, J. C., GARCIA-ANGULO, P., GOULAO, L. F., ACEBES, J. L. & AMANCIO, S. (2013). **Mineral stress affects the cell wall composition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) callus.** *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 205-206, 111-120.

FOSTER, C., MARTIN, T. & PAULY, M. (2010a). **Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass). Part II: Carbohydrates.** *Journal of visualized experiments : JoVE* 37, e1837.

FOSTER, C. E., MARTIN, T. M. & PAULY, M. (2010b). **Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (Lignocellulosic biomass) Part I: Lignin.** e1745.

FU, C., MIELENZ, J. R., XIAO, X. & other authors (2011). **Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3803-3808.

GARVIN, D. F. (2008). **Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research.** *Crop Sci* 48, S-69-S-84.

GIRIN, T., DAVID, L. C., CHARDIN, C., SIBOUT, R., KRAPP, A., FERRARIO-MÉRY, S. & DANIEL-VEDELE, F. (2014). **Brachypodium: a promising hub between model species and cereals.** *Journal of experimental botany* 65, 5683-5696.

GLAZEBROOK, J., CHEN, W., ESTES, B., CHANG, H.-S., NAWRATH, C., MÉTRAUX, J.-P., ZHU, T. & KATAGIRI, F. (2003). **Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping.** *The Plant Journal* 34, 217-228.

GLAZEBROOK, J. (2005). **Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.** *Annu Rev Phytopathol* 43, 205-227.

GOMEZ, L. D., WHITEHEAD, C., ROBERTS, P. & MCQUEEN-MASON, S. J. (2011). **High-throughput Saccharification Assay for Lignocellulosic Materials.** e3240.

HERMS, D. A. & MATTSON, W. J. (1992). **The Dilemma of Plants: To Grow or Defend.** *The Quarterly Review of Biology* 67, 283-335.

HORVATH, E., CSISZAR, J., GALLE, A., POOR, P., SZEPESI, A. & TARI, I. (2015). **Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress.** *Journal of plant physiology* 183, 54-63.

HUA, S. S., GROSJEAN, O. K. & BAKER, J. L. (1999). **Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds.** *Letters in applied microbiology* 29, 289-291.

HUANG, J., GU, M., LAI, Z., FAN, B., SHI, K., ZHOU, Y.-H., YU, J.-Q. & CHEN, Z. (2010). **Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress.** *Plant physiology* 153, 1526 - 1538.

INTERNATIONAL, I. B. (2010). **Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*.** *Nature* 463, 763-768.

JIA, J., YU, B., WU, L. & other authors (2014). **Biomass Enzymatic Saccharification Is Determined by the Non-KOH-Extractable Wall Polymer Features That Predominately Affect Cellulose Crystallinity in Corn.** *PloS one* 9, e108449.

JUNG, H. J., SAMAC, D. A. & SARATH, G. (2012). **Modifying crops to increase cell wall digestibility.** *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 185-186, 65-77.

KARABOURNIOTIS, G., LIAKOPOULOS, G., NIKOLOPOULOS, D., BRESTA, P., STAVROULAKI, V. & SUMBELE, S. (2014). **"Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence": two dilemmas with soluble phenolics as a joker.** *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 227, 21-27.

KELLER, B. & FEUILLET, C. (2000). **Colinearity and gene density in grass genomes.** *Trends in plant science* 5, 246-251.

KOVACIK, J., GRUZ, J., BACKOR, M., STRNAD, M. & REPCA, M. (2009). **Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants.** *Plant cell reports* 28, 135-143.

KUNKEL, B. N. & BROOKS, D. M. (2002). **Cross talk between signaling pathways in pathogen defense.** *Current opinion in plant biology* 5, 325-331.

LEE, Y., CHEN, F., GALLEGO-GIRALDO, L., DIXON, R. & VOIT, E. (2011). **Integrative analysis of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) suggests new metabolic control mechanisms for monolignol biosynthesis.** *PLoS Comput Biol* 7, e1002047.

LESLIE, C. & ROMANI, R. (1986). **Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis.** *Plant cell reports* 5, 144-146.

LI, M., LIU, M., PENG, F. & FANG, L. (2015). **Influence factors and gene expression patterns during MeJa-induced gummosis in peach.** *Journal of plant physiology* 182, 49-61.

LI, Q., SONG, J., PENG, S., WANG, J. P., QU, G. Z., SEDEROFF, R. R. & CHIANG, V. L. (2014). **Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production.** *Plant biotechnology journal*.

LI, X., WENG, J. K. & CHAPPLE, C. (2008). **Improvement of biomass through lignin modification.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54, 569-581.

LI, X., CHEN, W., ZHAO, Y., XIANG, Y., JIANG, H., ZHU, S. & CHENG, B. (2013). **Downregulation of caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) by RNA interference leads to reduced lignin production in maize straw.** *Genetics and molecular biology* 36, 540-546.

LIEPMAN, A. H., WIGHTMAN, R., GESHI, N., TURNER, S. R. & SCHELLER, H. V. (2010). **Arabidopsis - a powerful model system for plant cell wall research.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61, 1107-1121.

LORENZO, O., PIQUERAS, R., SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. & SOLANO, R. (2003). **ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense.** *The Plant cell* 15, 165-178.

MACADAM, J. & GRABBER, J. (2002). **Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p -coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades.** *Planta* 215, 785-793.

MALINOVSKY, F. G., FANGEL, J. U. & WILLATS, W. G. (2014). **The role of the cell wall in plant immunity.** *Frontiers in plant science* 5, 178.

MANSFIELD, S. D., KANG, K.-Y. & CHAPPLE, C. (2012a). **Designed for deconstruction – poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production.** *New Phytologist* 194, 91-101.

MANSFIELD, S. D., KANG, K. Y. & CHAPPLE, C. (2012b). **Designed for deconstruction - poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production.** *New Phytologist* 194, 91-101.

MARRIOTT, P. E., SIBOUT, R., LAPIERRE, C., FANGEL, J. U., WILLATS, W. G., HOFTE, H., GOMEZ, L. D. & MCQUEEN-MASON, S. J. (2014). **Range of cell-wall alterations enhance saccharification in Brachypodium distachyon mutants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

MATIAS DE OLIVEIRA, D., FINGER-TEIXEIRA, A., RODRIGUES MOTA, T. & other authors (2014). **Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis.** *Plant biotechnology journal*.

MCKEEHEN, J. D., BUSCH, R. H. & FULCHER, R. G. (1999). **Evaluation of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phenolic Acids during Grain Development and Their Contribution to Fusarium Resistance.** *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 1476-1482.

MOLINARI, H. B., PELLNY, T. K., FREEMAN, J., SHEWRY, P. R. & MITCHELL, R. A. (2013). **Grass cell wall feruloylation: distribution of bound ferulate and candidate gene expression in Brachypodium distachyon.** *Frontiers in plant science* 4, 50.

MUR, L. A., ALLAINGUILLAUME, J., CATALAN, P., HASTEROK, R., JENKINS, G., LESNIEWSKA, K., THOMAS, I. & VOGEL, J. (2011). **Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research.** *The New phytologist* 191, 334-347.

NASEEM, M., KALTDORF, M. & DANDEKAR, T. (2015). **The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways.** *Journal of experimental botany*.

NOIR, S., BOMER, M., TAKAHASHI, N., ISHIDA, T., TSUI, T. L., BALBI, V., SHANAHAN, H., SUGIMOTO, K. & DEVOTO, A. (2013). **Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode.** *Plant physiology* 161, 1930-1951.

OOKAWA, T., INOUE, K., MATSUOKA, M. & other authors (2014). **Increased lodging resistance in long-culm, low-lignin *gh2* rice for improved feed and bioenergy production.** *Scientific reports* 4, 6567.

PADMAVATI, M., SAKTHIVEL, N., THARA, K. V. & REDDY, A. R. (1997). **Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids.** *Phytochemistry* 46, 499-502.

PARK, S. H., ONG, R. G., MEI, C. & STICKLEN, M. (2014). **Lignin down-regulation of *Zea mays* via dsRNAi and klason lignin analysis.** *Journal of visualized experiments : JoVE*.

PAULY, M. & KEEGSTRA, K. (2008). **Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels.** *The Plant Journal* 54, 559-568.

PAULY, M. & KEEGSTRA, K. (2010). **Plant cell wall polymers as precursors for biofuels.** *Current opinion in plant biology* 13, 305-312.

PEDERSEN, J. F., VOGEL, K. P. & FUNNELL, D. L. (2005). **Impact of Reduced Lignin on Plant Fitness.** *Crop Science* 45, 812.

PENNING, B. W., SYKES, R. W., BABCOCK, N. C. & other authors (2014). **Genetic Determinants for Enzymatic Digestion of Lignocellulosic Biomass Are Independent of Those for Lignin Abundance in a Maize Recombinant Inbred Population.** 165, 1475-1487.

PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. (2011). **Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes.** *Phytopathology* 101, 929-934.

PU, Y., HU, F., HUANG, F., DAVISON, B. & RAGAUSKAS, A. (2013). **Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments.** *Biotechnology for biofuels* 6, 15.

RALPH, J., LUNDQUIST, K., BRUNOW, G. & other authors (2004). **Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids.** *Phytochem Rev* 3, 29-60.

RALPH, J. (2010). **Hydroxycinnamates in lignification.** *Phytochem Rev* 9, 65-83.

RANCOUR, D. M., HATFIELD, R. D., MARITA, J. M., ROHR, N. A. & SCHMITZ, R. J. (2015). **Cell wall composition and digestibility alterations in *Brachypodium distachyon* achieved through reduced expression of the UDP-arabinopyranose mutase.** *Frontiers in plant science* 6, 446.

RAO, M. V., LEE, H.-I. & DAVIS, K. R. (2002). **Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death.** *The Plant Journal* 32, 447-456.

SHADLE, G., CHEN, F., SRINIVASA REDDY, M. S., JACKSON, L., NAKASHIMA, J. & DIXON, R. A. (2007). **Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: Shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality.** *Phytochemistry* 68, 1521-1529.

SHEN, H., HE, X., POOVAIAH, C. R. & other authors (2012). **Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks.** *New Phytologist* 193, 121-136.

SIQUEIRA, G., MILAGRES, A. M., CARVALHO, W., KOCH, G. & FERRAZ, A. (2011). **Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides.** *Biotechnology for biofuels* 4, 7.

SMITH, J. L., DE MORAES, C. M. & MESCHER, M. C. (2009). **Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants.** *Pest management science* 65, 497-503.

SOMERVILLE, C. (2006). **Cellulose synthesis in higher plants.** *Annual review of cell and developmental biology* 22, 53-78.

SOUZA, V. C. & LORENZE, H. (2012). **Botânica Sistemática**, pp. 230. 2012.

THALER, J. S., AGRAWAL, A. A. & HALITSCHKE, R. (2010). **Salicylate-mediated interactions between pathogens and herbivores.** *Ecology* 91, 1075-1082.

- THOMMA, B. P., PENNINGCKX, I. A., BROEKAERT, W. F. & CAMMUE, B. P. (2001). **The complexity of disease signaling in Arabidopsis**. *Current opinion in immunology* 13, 63-68.
- TIAN, D., PEIFFER, M., DE MORAES, C. M. & FELTON, G. W. (2014). **Roles of ethylene and jasmonic acid in systemic induced defense in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Helicoverpa zea***. *Planta* 239, 577-589.
- TRABUCCO, G. M., MATOS, D. A., LEE, S. J., SAATHOFF, A. J., PRIEST, H. D., MOCKLER, T. C., SARATH, G. & HAZEN, S. P. (2013). **Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid O-methyltransferase in *Brachypodium distachyon***. *BMC biotechnology* 13, 61.
- UEDA, J. & KATO, J. (1982). **Inhibition of cytokinin-induced plant growth by jasmonic acid and its methyl ester**. *Physiologia plantarum* 54, 249-252.
- UEDA, J., MIYAMOTO, K. & KAMISAKA, S. (1995). **Inhibition of the synthesis of cell wall polysaccharides in oat coleoptile segments by jasmonic acid: Relevance to its growth inhibition**. *Journal of Plant Growth Regulation* 14, 69-76.
- VAN ACKER, R., VANHOLME, R., STORME, V., MORTIMER, J., DUPREE, P. & BOERJAN, W. (2013). **Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana***. *Biotechnology for biofuels* 6, 46.
- VAN DER REST, B., DANOUN, S., BOUDET, A.-M. & ROCHANGE, S. F. (2006). **Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools**. *Journal of experimental botany* 57, 1399-1411.
- VOGEL, J. (2008). **Unique aspects of the grass cell wall**. *Curr Opin Plant Biol* 11, 301-307.
- VOGEL, J. & BRAGG, J. (2009). ***Brachypodium distachyon*, a New Model for the Triticeae**. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*, pp. 427-449. Edited by G. J. Muehlbauer & C. Feuillet: Springer US.
- VOGT, T. (2010). **Phenylpropanoid biosynthesis**. *Molecular plant* 3, 2-20.
- YAMANE, H., SUGAWARA, J., SUZUKI, Y., SHIMAMURA, E. & TAKAHASHI, N. (1980). **Syntheses of Jasmonic Acid Related Compounds and Their Structure-Activity Relationships on the Growth of Rice Seedlings**. *Agricultural and Biological Chemistry* 44, 2857-2864.

YANG, B. & WYMAN, C. E. (2008). **Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2, 26-40.

ZAVALA, J. A. & BALDWIN, I. T. (2006). **Jasmonic acid signalling and herbivore resistance traits constrain regrowth after herbivore attack in *Nicotiana attenuata*.** *Plant, cell & environment* 29, 1751-1760.

ZENG, Y., ZHAO, S., YANG, S. & DING, S.-Y. (2014). **Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels.** *Current opinion in biotechnology* 27, 38-45.

ZHANG, Y. & TURNER, J. G. (2008). **Wound-Induced Endogenous Jasmonates Stunt Plant Growth by Inhibiting Mitosis.** *PloS one* 3, e3699.

ZHAO, Q. & DIXON, R. A. (2014). **Altering the Cell Wall and Its Impact on Plant Disease: From Forage to Bioenergy.** *Annual Review of Phytopathology* 52, 69-91.

ZHONG, R., LEE, C., MCCARTHY, R. L., REEVES, C. K., JONES, E. G. & YE, Z. H. (2011). **Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors.** *Plant & cell physiology* 52, 1856-1871.