

RAYSA MAYARA DE JESUS SOUSA

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM SOJA APÓS  
EXPOSIÇÃO A REGULADORES DE CRESCIMENTO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

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

T

S725r  
2019  
Sousa, Raysa Mayara de Jesus, 1991-  
Respostas morfofisiológicas e moleculares em soja após  
exposição a reguladores de crescimento / Raysa Mayara de Jesus  
Sousa. – Viçosa, MG, 2019.  
viii, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cleberson Ribeiro.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Soja - Crescimento. 2. Paredes celulares. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Mestrado  
em Fisiologia Vegetal. II. Título.


CDD 22 ed. 633.34

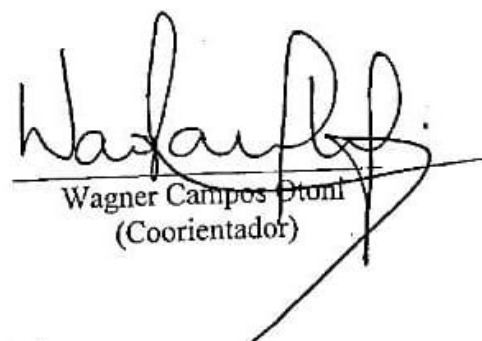
RAYSA MAYARA DE JESUS SOUSA

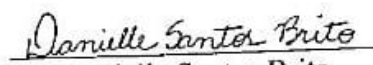
**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM SOJA APÓS  
EXPOSIÇÃO A REGULADORES DE CRESCIMENTO**


Dissertação apresentada 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: 22 de fevereiro de 2019.

  
Diego Silva Batista  
(Coorientador)

  
Wagner Campos Dtoni  
(Coorientador)

  
Danielle Santos Brito

  
Cleberson Ribeiro  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a Jesus Cristo pelo dom da vida e a oportunidade de ter nascido e crescido ao lado de uma família tão especial. Ao meu pai Raimundo, minha mãe Carminha e minha irmã Rayena muito obrigada, amo vocês!

Ao meu querido amor Wesley, que nestes anos de estudo e aprendizado tem caminhado comigo lado a lado, sempre me apoiando e incentivando mesmo na distância. E o mais importante de tudo: acreditando em mim! Afinal de contas, somos uma família... Você e a nossa Melzinha iluminam minha vida... Te amo muito!

A toda minha família do Ceará, Rio de Janeiro, Minas Gerais, mas em especial a minha Vovó Lilia. Que embora não tenha tido as mesmas oportunidades que eu tive nos estudos, como a simples, porém grandiosa capacidade de ler e escrever. Com seus lindos olhinhos não entenderá o que escrevo, mas com seu coração compreenderá! Muito obrigada minha linda!

Nesta jornada científica fiz novas e reforcei antigas amizades, que nas dificuldades e felicidades da vida nos fazem sentir capazes de ultrapassar fronteiras e atingir novos horizontes. Muito obrigada meus queridos amigos de Viçosa, em especial: Amanda, Miller, Dinorah, Hellen (quase minha mãe em Viçosa), Nicolas (meu conterrâneo querido), Gleyson, Thalita, Nágila, Elli, Ricardo, Danielle Brito... Contei e sei que sempre poderei contar com vocês!

Em Viçosa ganhei mais que um lugar para trabalhar e aprender, ganhei uma família repleta de pessoas especiais e histórias para contar. E quantas histórias... LCT meu muito obrigada por tudo! Vocês são como uma jóia dentro da grandiosa UFV. Em especial aos meus queridos amigos: Tati, Amanda, Kamila, Sérgio, Evandro, Kris, Gaby, Lud, Wellington. Vocês sensacionais, minha chegada até aqui em grande parte devo a vocês!

Novamente gostaria de agradecer a Tatiane, nossa Tati, que foi praticamente minha coorientadora. Mesmo com suas ocupações, tarefas e obrigações nunca se queixou em me explicar e ensinar coisas aparentemente simples, mas que nessa nova jornada na cultura de tecidos de plantas eram grandes desafios para mim. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Diego Batista, meu muito obrigada! Um exemplo de pesquisador, que me apoiou em um dos momentos que mais precisava... Com muito orgulho posso dizer que aprendi muito com você, e de presente ainda ganhei um grande amigo! Saudações tricolores!

Ao meu querido coorientador, professor Wagner Otoni, que sempre com bom humor, atitude, profissionalismo e empatia tem capacidade de agregar tudo a todos. Com muita gratidão

lhe digo obrigada pelo acolhimento, orientação, pensamentos positivos, amizade... Uma mente brilhante influencia pessoas brilhantes, e é assim que vejo o senhor com o LCT. Muito obrigada!

Ao meu coorientador professor Dimas Ribeiro que também me apoiou muito desde de o início do meu mestrado. Sempre me orientou em tudo que precisei, me ajudando a idealizar e realizar este trabalho. Sempre serei grata, muito obrigada!

Ao meu orientador Cleberson Ribeiro, que mesmo na distância por conta de seu pós-doc na França e de ainda não me conhecer como estudante, me auxiliou e acreditou na minha capacidade de trabalho. Muito obrigada professor, foi uma grande parceria!

À Capes pelo auxílio financeiro, ao Programa de Pós-graduação de Fisiologia Vegetal pela minha capacitação, e a Universidade Federal de Viçosa - UFV. Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Raysa Mayara de Jesus Sousa é filha de Maria do Carmo de Jesus e Raimundo Segundo de Sousa, natural de Fortaleza- CE, nasceu no dia 24 de outubro de 1991. Em Agosto de 2010 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal do Ceará (UFC) onde obteve o título de Bacharel em Agronomia em janeiro de 2017, ingressando no mesmo ano no curso de Pós-graduação e Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Referências .....	2
CAPÍTULO 1 .....	5
Ação das giberelinas sobre as respostas fisiológicas relacionadas ao acamamento em soja .....	5
RESUMO.....	5
1 Introdução .....	6
2 Material e métodos.....	8
3 Resultados .....	17
4 Figuras capítulo 1.....	22
5 Discussão .....	32
6 Conclusão.....	37
7 Referências.....	37
CAPÍTULO 2 .....	43
Níveis de giberelinas alteram o crescimento, o metabolismo primário e a composição de lignina e celulose em plantas de soja cultivadas <i>in vitro</i> .....	43
RESUMO .....	43
1 Introdução .....	44
2 Material e métodos.....	46
3 Resultados .....	56
4 Figuras capítulo 2.....	61
5 Discussão .....	72
6 Conclusão.....	77
7 Referências.....	78
Conclusões gerais .....	82

## RESUMO

SOUSA, Raysa Mayara de Jesus Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Respostas morfofisiológicas e moleculares em soja após exposição a reguladores de crescimento.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Diego Silva Batista, Dimas Mendes Ribeiro e Wagner Campos Otoni.

A soja tem uma posição importante na agricultura mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor deste grão no mundo. Na cultura, o acamamento consiste em uma característica agrônômica negativa que afeta o seu desenvolvimento, reduzindo a produtividade devido à baixa interceptação de luz e o deslocamento permanente do caule. Visando alterar a morfologia da planta, minimizando os efeitos do acamamento, reguladores de crescimento vem sendo utilizados na agricultura para modular o crescimento e o desenvolvimento de acordo com as condições desejadas. O paclobutrazol (PAC) consiste em um destes reguladores que atua na inibição da biossíntese de giberelinas (GAs) modificando o alongamento da parte aérea, desenvolvimento da raiz e divisão celular. No entanto, alterações morfofisiológicas e moleculares provocadas pela regulação dos níveis de GAs na redução à incidência de acamamento permanecem desconhecidas em muitas culturas. Um exemplo são as alterações causadas na parede vegetal, durante o desenvolvimento da planta, em que celulose e lignina são os componentes que apresentam maiores variações. Desta forma, este trabalho objetivou através do cultivo *ex vitro* e *in vitro* entender como a regulação dos níveis de GAs na soja por PAC, poderiam atenuar os efeitos do acamamento. A utilização do PAC nos cultivos *ex vitro* e *in vitro* reduziu a arquitetura da parte aérea da soja através de modificações na partição de biomassa, comprimento do caule e maior conteúdo de celulose na parede celular. No cultivo *ex vitro*, a redução dos níveis de GAs induziu plantas com anatomia foliar, caulinar e da raiz desenvolvidas por alteração na espessura de tecidos que favoreceu a realização de trocas gasosas, transporte de elétrons e modificação na utilização e produção de metabólitos primários. A aplicação de GA<sub>3</sub> induziu o acúmulo de biomassa e maior alongamento do caule em ambos os cultivos. Porém, maiores níveis GAs na soja cultivada *in vitro* resultou em modificações na massa seca e anatomia da raiz distintas do cultivo *ex vitro*. Neste trabalho, a aplicação de PAC como regulador induziu características fenotípicas de interesse como a redução do comprimento do caule, incrementos na taxa fotossintética com alterações no metabolismo de açúcares e maior conteúdo de celulose na parede celular. No entanto, a aplicação de GA<sub>3</sub> promoveu o aumento no conteúdo de lignina na parede celular, podendo contribuir com maior rigidez e resistência

física nos tecidos condutores e de sustentação. Sendo novos estudos necessários para confirmar a eficiência na utilização de PAC para redução do acamamento na soja.

## ABSTRACT

SOUSA, Raysa Mayara de Jesus Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Morphophysiological and molecular responses in soybean after exposure to growth regulators.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-Advisers: Diego Silva Batista, Dimas Mendes Ribeiro and Wagner Campos Otoni.

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) has an important position in agriculture worldwide. Brazil is the second biggest soybean's producer in the world. In soybean's growth lodging is considered a negative agronomic trait, which affects crop development reducing grain yield due to low light interception and permanent stem displacement. Growth regulators have been used in agriculture for a long time to modulate plant growth and development according to desired conditions. Paclobutrazol (PAC) is a growth retardant acting as inhibitor of gibberellin biosynthesis, which are plant hormones responsible for shoot elongation, root development and cell division. On the other hand, changes responsible for decreasing lodging by GAs biosynthesis inhibition remains unclear in many crops. An example it is the plant cell wall, which is composed according to the growth type during the plant development, where cellulose and lignin are the main altered. In this way, this work researched through *ex vitro* and *in vitro* experiments the question of how PAC might regulates GA's levels in soybean to attenuate lodging effects. The use of PAC as growth regulator changed soybean's shoot architecture through biomass partition, reduced stem height; higher cellulose content in the cell wall, where these traits might benefit lodging resistance in soybean. In addition to lower stem length, during soybean *ex vitro* growth reduced endogenous GA's levels induced leaf, stem and root anatomical changes, which favored photosynthetic efficiency and primary metabolism. Higher biomass and stem length were observed in the *ex vitro* and *in vitro* soybean's growth with GA<sub>3</sub> treatment. However, dry biomass and root anatomy were modified with increased GA's levels at *in vitro* and *ex vitro* soybean's growth, differently. In this study, PAC treatment induced phenotypic characteristics of interest such as lower stem length, higher photosynthetic rates with primary metabolism regulation, also well as higher cellulose content in soybean's cell wall. On the other hand, exogenous GA<sub>3</sub> induced higher lignin content in the soybean's cell wall that might contributed with higher strength and physical resistance at conduction and support tissues. It is worth highlight that new studies are required to confirm PAC uses to reduce soybean lodging. In addition, understand if PAC applying for lodging resistance might decreases grain filling and yield.

## INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa posição de destaque entre as culturas cultivadas mais importantes do mundo, superando valores de importação e exportação de outras espécies agriculturáveis como trigo, milho e arroz (Foyer et al. 2018). Estudos relacionados à soja têm focado na regulação das características favoráveis ao seu cultivo (Sedivy et al. 2017; Silva et al. 2017; Talliercio et al. 2017; Diers et al. 2018), visando otimizar características agronômicas importantes como resistência a pragas e doenças, produção de biomassa, quantidade e qualidade de sementes dentre outras (Litrico & Violle 2015).

Uma característica agronômica negativa, que afeta diretamente a qualidade das sementes, consiste no acamamento reduzindo em média 30% a produtividade durante a fase de poda e enchimento de grãos (Kitabatake et al. 2019), afetando a qualidade de culturas agrícolas como trigo (Peng et al. 2014), milho (Kamran et al. 2018), arroz (Setter et al. 1997; Kashiwagi et al. 2008; Liu et al. 2018) e soja (Yamaguchi et al. 2014; Chen et al. 2015; Liu et al. 2017). Sua ocorrência é provocada pelo deslocamento permanente do caule de acordo com a altura e o diâmetro da planta (Wang & Li 2008; Okuno et al. 2014; Yin et al. 2017), estabilidade, resistência e força do caule (Shah et al. 2016), associados a fatores externos como vento, chuva e disponibilidade de nutrientes no solo (Berry et al. 2004). Normalmente, a morfologia da parte aérea e das raízes das plantas são regiões afetadas pelo acamamento, podendo ser correlacionado à composição química da parede celular (Wang et al. 2012; Huang et al. 2015). Liu et al. (2018) observaram como o encurtamento dos entrenós basais no arroz, contribuiu na maior resistência ao acamamento. Desde a “revolução verde”, o deslocamento do caule vem sendo controlado na agricultura com a introdução de variedades semi-anãs de trigo que tiveram a inserção do gene *reduced height-1(Rht-B1/ Rht-D1)* e *semi-dwarf1 (sd1)* (Hedden 2003).

Diversas ferramentas como o cruzamento genético, biologia molecular e estatística são utilizadas para modular características agronômicas de interesse (Litrico & Violle 2015). Normalmente, estudos sobre a associação entre estas características são desenvolvidos em áreas experimentais que apresentam condições ambientais variáveis, o que dificulta sua avaliação (Chen et al. 2015). Por este motivo, alternativamente, experimentos conduzidos em casa de vegetação são realizados em condições controladas permitindo ajustar a luminosidade, temperatura, umidade, disponibilidade hídrica e concentração de CO<sub>2</sub>, propiciando condições microclimáticas ideais para o desenvolvimento e produção das plantas (Dong et al. 2015). Assim como o cultivo em casa de vegetação, a condição “*in vitro*” permite conduzir

experimentos em condições controladas, proporciona também o desenvolvimento das plantas em condições assépticas (Thorpe 2007).

A regulação do crescimento e desenvolvimento através do hormônio vegetal giberelina (GAs) é um tópico frequentemente estudado desde a sua descoberta em plantas de arroz infectadas com fungo *Gibberella fujikuroi* (Hedden & Sponsel 2015). A biossíntese das GAs nas plantas ocorre em três compartimentos celulares: plastídeo, retículo endoplasmático, e citoplasma (Rizza & Jones 2018). A homeostase deste hormônio pode ser mantida por mecanismos distintos, sendo o mais comum a desativação da GA 2-oxidases (GA2oxs) (Hedden & Thomas 2012). É possível utilizar reguladores de crescimento antagonistas às GAs para reduzir o comprimento da parte aérea, através da redução do alongamento e da taxa de divisão celular (Rademacher, 2000). O paclobutrazol (PAC) é um regulador hormonal que retarda o crescimento das plantas, com mecanismo de ação concentrado no retículo endoplasmático inibindo as enzimas mono-oxigenases responsáveis por catalisar etapas importantes da biossíntese das GAs (Rademacher 2000).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar como a aplicação de PAC controla os níveis de GAs modulando o padrão de crescimento da linhagem UFVS 86B10, através de modificações morfofisiológicas e moleculares durante cultivo *ex vitro* e *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

BERRY, P. M. et al. Understanding and reducing lodging in cereals. **Advances in Agronomy**, v. 84, n. 04, p. 215-269, 2004.

CHEN, H. et al. Combining QTL and candidate gene analysis with phenotypic model to unravel the relationship between lodging and related traits in soybean. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 4, p. 37-43, 2017.

DIERS, B. W. et al. Genetic architecture of soybean yield and agronomic traits. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 10, p. 3367-3375, 2018.

DONG, C. et al. Evaluation of wheat growth, morphological characteristics, biomass yield and quality in Lunar Palace-1, plant factory, green house and field systems. **Acta Astronautica**, v. 111, p. 102-109, 2015.

FOYER, C. H. et al. Modelling predicts that soybean is poised to dominate crop production across Africa. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 1, p. 373-385, 2019.

HEDDEN, P. The genes of the Green Revolution. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2003.

- HEDDEN, P.; THOMAS, S. G. Gibberellin Biosynthesis and its Regulation. **Biochemical Journal**, v. 444, n. 1, p. 11-25, 2012.
- HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A century of Gibberellin Research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 740-760, 2015.
- HUANG, et al. A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. **The Plant Cell**, v. 27, n. 6, p. 1681-1696, 2015.
- KAMRAN, M. et al. Application of paclobutrazol: a strategy for inducing lodging resistance of wheat through mediation of plant height, stem physical strength, and lignin biosynthesis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 29, p. 29366-29378, 2018.
- KAMRAN, M. et al. Effect of paclobutrazol, a potential growth regulator on stalk mechanical strength, lignin accumulation and its relation with lodging resistance of maize. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 317-332, 2018.
- KASHIWAGI, T. et al. Improvement of lodging resistance with QTLs for stem diameter in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 117, n. 5, p. 749-757, 2008.
- KITABATAKE, T. et al. Morphological traits associated with the quantitative trait locus for lodging tolerance in soybean. **Crop Science**, 2019.
- LITRICO, I.; VIOLLE, C. Diversity in plant breeding: a new conceptual framework. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 10, p. 604-613, 2015.
- LIU, Z. et al. Selection of soybean elite cultivars based on phenotypic and genomic characters related to lodging tolerance. **Plant Breeding**, v. 136, n. 4, p. 526-538, 2017.
- LIU, C. et al. Shortened basal internodes encodes a gibberellin 2-oxidase and contributes to lodging resistance in rice. **Molecular Plant**, v. 11, n. 2, p. 288-299, 2018.
- OKUNO, A. et al. New approach to increasing rice lodging resistance and biomass yield through the use of high gibberellin producing varieties. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e86870, 2014.
- PENG, D. et al. Lodging resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.): Lignin accumulation and its related enzymes activities due to the application of paclobutrazol or gibberellin acid. **Field Crops Research**, v. 157, p. 1-7, 2014.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Biology**, v. 51, n. 1, p. 501-531, 2000.
- RIZZA, A.; JONES, A. M. The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 9-15, 2019.
- SEDIVY, E. J. et al. Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. **New Phytologist**, v. 214, n. 2, p. 539-553, 2017.
- SETTER, T. L. et al. Lodging reduces yield of rice by self-shading and reductions in canopy photosynthesis. **Field Crops Research**, v. 49, n. 2-3, p. 95-106, 1997.

SHAH, D. U. et al. The strength of plants: theory and experimental methods to measure the mechanical properties of stems. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 16, p. 4497-4516, 2017.

SILVA, F. et al. **Soybean Breeding**. Vicosa: Springer, 2017.

TALIERCIO, E. et al. Changes in gene expression between a soybean F1 hybrid and its parents are associated with agronomically valuable traits. **PloS One**, v. 12, n. 5, p. e0177225, 2017.

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.

WANG, J. et al. Investigation of cell wall composition related to stem lodging resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by FTIR spectroscopy. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 7, p. 856-863, 2012.

YAMAGUCHI, N. et al. Quantitative trait loci associated with lodging tolerance in soybean cultivar 'Toyoharuka'. **Breeding Science**, v. 64, n. 4, p. 300-308, 2014.

YIN, Z. et al. Soybean plant height QTL mapping and meta-analysis for mining candidate genes. **Plant Breeding**, v. 136, n. 5, p. 688-698, 2017.

## CAPÍTULO 1

### Ação das giberelinas sobre as respostas fisiológicas relacionadas ao acamamento em soja

#### RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem destaque no cenário agrícola nacional e mundial, onde estudos relacionados à espécie têm focado na regulação das características agronômicas favoráveis ao seu cultivo. Um dos critérios na seleção de características para resistência ao acamamento, consiste na altura da planta visando modular a morfologia no desenvolvimento da parte aérea. No entanto, muitas vezes tal estratégia pode não ser suficiente para selecionar características de interesse, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre a fisiologia, morfologia e metabolismo da planta. O presente trabalho teve como objetivo verificar como a regulação dos níveis de giberelinas por paclobutrazol (PAC) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) influencia o acamamento, a partir da linhagem de soja UFV. Os resultados revelaram que a aplicação de PAC promoveu a redução do porte caulinar, assim como a alocação de biomassa no órgão, enquanto a aplicação de GA<sub>3</sub> induziu efeito contrário. Além disso, a aplicação de PAC induziu aumento na assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, da fluorescência da clorofila *a*, aumento na concentração de clorofilas totais e rearranjo da anatomia foliar. Adicionalmente, a regulação dos níveis de GAs por PAC induziu alterações no metabolismo primário da soja, principalmente na utilização de açúcares, que também alterou a composição da parede celular. Desta forma, a aplicação de PAC induziu o aumento do conteúdo de celulose, enquanto GA<sub>3</sub> o aumento do conteúdo de lignina.

**Palavras-chave:** *parede celular; acamamento; lignina; celulose*

## 1 Introdução

Atualmente, o Brasil consiste em um dos principais exportadores de soja no mundo, no entanto a produção deste grão na safra 2018/ 2019 está prevista para ter decréscimos na ordem de 593 milhões de toneladas, ocasionadas por reduções na produtividade brasileira (USDA 2019). Diversos fatores são correlacionados com os decréscimos na produção agrícola, como seca, alta e baixa temperatura, salinidade, vento (Pandey et al. 2017). O vento pode interferir diretamente na incidência de acamamento, que consiste no dobramento ou quebra definitiva do caule e/ ou raiz (Gardiner et al. 2016). O deslocamento do caule é normalmente correlacionado com a morfologia da planta, sendo o comprimento do caule uma das principais características agronômicas melhoradas para resistência ao acamamento (Kamran et al. 2018b), reduzindo perdas econômicas significativas na agricultura (Zheng et al. 2017).

O comprimento da parte aérea interfere na incidência de acamamento quando está em desequilíbrio com o peso e diâmetro do caule, considerados fatores associados à força física do caule (Kashiwagi et al. 2008). A resistência do caule é uma propriedade mecânica que dentre os principais parâmetros afetados são a geometria, as características estruturais e sua composição química (Shah et al. 2017). A composição do caule é regulada pela densidade, que aumenta com maior volume da fração sólida, composta pela espessura de células com crescimento secundário e com conteúdo de celulose (Shah 2013).

Estudos envolvendo a regulação dos níveis de GAs se iniciaram com a “revolução verde” na seleção de culturas semi-anãs (Binenbaum et al. 2018). Durante este período, a introdução de genes de nanismo em cereais como arroz [*semi-dwarf1 (sd1)*] e trigo [*reduced height-1(Rht-B1/ Rht-D1)*] permitiu que a redução no comprimento do caule, incapacitado de suportar o peso dos grãos, aumentasse a resistência ao acamamento (Hedden 2003). A identificação do gene de nanismo *Rht*, ortólogo de *Arabidopsis GAI* e *dwarf8* no milho por Peng et al. (1997) permitiu compreender que a maior resistência ao acamamento nas culturas melhoradas durante a revolução verde foi ocasionada pela regulação dos níveis de GAs.

Muitas das cultivares resistentes ao acamamento possuem a característica de encurtamento dos entrenós por serem responsivas às GAs, sendo até os dias de hoje a regulação deste hormônio uma ferramenta importante para o desenvolvimento e melhoramento de novas cultivares com estas propriedades (Liu et al. 2018). Um outro fator que também interfere na menor resistência a curvatura do caule, consiste na composição da parede celular, que varia com a espécie e o estado de desenvolvimento dos tecidos (Loque et al. 2015). Durante a formação da parede celular primária ocorre o alongamento das células, sendo seus principais componentes microfibrilas de celulose, hemiceluloses e pectinas (Cosgrove 2005); já quando o alongamento é cessado se inicia a deposição de parede celular secundária com deposição de celulose, hemicelulose e lignina (Loqué et al. 2015). A celulose é sintetizada na membrana plasmática no Complexo Celulose Sintase (CSC) por uma família de genes pertencentes a *cellulose synthase-A (CesA)* na formação de parede primária e secundária (Cosgrove 2005; Yin et al. 2009). A lignina é um polímero polifenólico gerado pela oxidação de monolignóis que realizam ligações covalentes com as hemiceluloses proporcionando maior força e rigidez no desenvolvimento da parede celular (Zhong & Ye 2014).

Muitos estudos buscam correlacionar como a regulação dos níveis de GAs poderiam impactar na composição da parede celular através dos teores de celulose e de lignina (Bielmelt et al. 2004; Guo et al. 2015; Huang et al. 2015; Wang et al. 2017; Falcioni et al. 2017, 2018). Análises de expressão de genes na biossíntese de celulose, dos conteúdos de GAs e de anatomia permitiram inferir que no arroz o crescimento secundário é regulado pelas GAs (Huang et al. 2015). Sendo essas alterações relacionadas ao comprimento e número de fibras no xilema em espécies arbóreas (Eriksson et al. 2000); assim como redução de acamamento através da regulação da biossíntese de lignina em milho (Kamran et al. 2018a) e trigo (Kamran et al. 2018b). Em plântulas de soja, a redução no conteúdo de celulose induziu maior incidência de acamamento (Liu et al. 2016). No entanto, existem muitas lacunas a serem elucidadas a respeito das causas do tombamento do caule, assim como não se sabe se composição química, crescimento e diferenciação celular poderiam ser regulados por GAs na soja. Por este motivo o presente trabalho

buscou entender como a regulação dos níveis de GAs poderia regular o crescimento da cultivar de soja UFVS 86B10, que apresenta hábito de crescimento indeterminado.

## **2 Material e métodos**

### *2.1 Material vegetal e condições de cultivo*

Sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivar UFVS 86B10, foram adquiridas a partir do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro/UFV. A linhagem utilizada apresenta hábito de crescimento indeterminado, que interfere no comprimento do caule com medidas superiores as cultivares comerciais utilizadas. As sementes foram semeadas em bandeja de germinação com substrato comercial (Tropstrato HT hortaliças<sup>®</sup>). Sete dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 5L. O substrato utilizado para cultivo foi preparado a partir de uma mistura de 75% de solo do tipo argiloso, e 25% de substrato comercial (Tropstrato HT hortaliças<sup>®</sup>). A adubação de base foi composta de 4,5g de calcário dolomítico, 3,8g de 4-4-18 (NPK), 3,8g de super fosfato simples, e 0,7g de KCl por vaso.

Ao atingirem o estágio vegetativo V3 com o segundo trifólio completamente expandido, as plantas foram submetidas as condições: controle água (H<sub>2</sub>O); ácido giberélico (GA<sub>3</sub> - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (50 µM); paclobutrazol (PAC) (1000µM) e a combinação entre ele (PAC + GA<sub>3</sub>).

A água e solução com PAC foram distribuídos sobre as superfícies dos substratos em que a soja estava sendo cultivada aplicados como H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> e solução de PAC em volumes de 20 mL, respectivamente. Enquanto GA<sub>3</sub> foi pulverizado nas folhas. Duas semanas após a imposição dos tratamentos, foram realizadas avaliações de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*), e coletas para análises de crescimento e bioquímicas.

### *2.2 Análise de crescimento*

Para a avaliação da taxa de crescimento relativo (TCR) foram coletadas 20 plantas (cinco por tratamento) para avaliação da relação biomassa acumulada antes e após o

período experimental. O modelo da equação utilizada foi determinada como descrito por Hunt (1978).

As demais plantas foram utilizadas para avaliação do comprimento caulinar e radicular (cm), diâmetro do caule (mm), área foliar total e específica, e para a quantificação da biomassa total e por órgãos específicos da planta. Adicionalmente à quantificação de biomassa, frações de massa foliar, caulinar e radicular foram utilizadas para determinação da fração de biomassa acumulada de acordo com o carbono drenado pelo órgão (Ribeiro et al. 2012). A razão entre a massa seca da parte aérea (folha, caule) e da raiz também foi avaliada. A área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE) foram avaliadas após a retirada das folhas de cada unidade experimental as quais foram fotografadas e mensuradas pelo programa Image J<sup>®</sup>. A avaliação da AFE ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) foi realizada conforme Zsögön (2011) através da relação entre a área foliar total (cm) e a massa seca da folha (g).

### 2.3 Trocas gasosas

As avaliações referentes à trocas gasosas foram realizadas no terceiro trifólio completamente expandido utilizando o analisador de gases a infravermelho (IRGA - modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Foram determinados a taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ); taxa transpiratória ( $E$ ); condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ) e concentração interna e ambiente de  $\text{CO}_2$  (razão  $C_i/C_a$ ). Estas medidas foram realizadas no período da manhã em casa de vegetação, mantendo a densidade de fluxo fotossintético (PPFD) a  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , concentração atmosférica de  $\text{CO}_2 \pm 400$  ppm, temperatura ambiente e umidade relativa 62%, constantes. A quantidade de luz azul foi de 10% para maximizar a abertura estomática (Flexas et al. 2008). Os parâmetros de respiração foram determinados em câmara de cultivo após 1h de aclimação ao escuro.

### 2.4 Fluorescência da *Chl a*

Para a cinética de indução foi utilizado o equipamento Minipam (Waz-Germany) pelo método utilizado para medidas de fluorescência foi de pulso de saturação, no qual o

terceiro trifólio completamente expandido foi aclimatado por um período de 30 min no escuro, deixando os centros de reação completamente oxidados para posterior pulso de luz saturante ( $PS = 8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 0,6s) obtendo o valor de fluorescência máxima ( $F_m$ ) (Schreiber et al. 1994). Posteriormente, as folhas foram iluminadas com luz actínica ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 7 min, com PS aplicado a cada 30 s obtendo os valores de adaptação pós-PS ( $F_m'$ ). Na cinética de curva de luz foi realizado uma rotina de incremento na intensidade de luz actínica ( $150 - 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por um período inferior a 10 s) em períodos de pré-aclimação de 30 s.

Os parâmetros de fluorescência da Chl *a* foram avaliados através de curvas de indução rápida na fotossíntese. No mesmo dia da determinação da taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  foram realizadas medidas da fluorescência da Chl *a* no terceiro trifólio completamente expandido com um fluorômetro do tipo MINI-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany.

As medidas de fluorescência foram utilizadas no cálculo dos parâmetros de máxima eficiência do FSII =  $[F_v/F_M = (F_m - F_o) / F_m]$ , a eficiência quântica atual do FSII ( $\phi\text{PSII}$ ) =  $[F_m - F_s / F_m']$ , coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ) =  $[(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')]$ , o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) =  $[NPQ = (F_m / F_m') - 1]$ , e a taxa atual de transporte de elétrons no FSII (ETR) =  $(\Delta F / F_m' \times \text{PPFD} \times 0.5 \times 0.84)$  (Lima et al. 2018; Neto et al. 2014).

### 2.5 Metabólitos primários e proteínas solúveis

Na quantificação dos metabólitos primários foram utilizadas amostras compostas pelo caule e pelo terceiro trifólio completamente expandido. Estas foram coletadas, pulverizadas em nitrogênio líquido, maceradas e posteriormente liofilizadas. À porção de 15 mg de massa liofilizada foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de ETOH 98%, em seguida a solução foi incubada por 20 m a  $80^\circ\text{C}$ , sob agitação contínua a 950 rpm. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 10 m, sendo o sobrenadante transferido para novos tubos. Posteriormente, o processo de extração foi repetido com as concentrações de ETOH 80 e 50%. Na fração etanólica solúvel foram determinados os teores de clorofilas

totais (Chl total), glicose, frutose, sacarose e aminoácidos totais; enquanto na fração insolúvel foram determinados os teores de proteínas totais e amido (Fernie et al. 2001).

### *2.6 Proteínas totais*

A determinação de proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Gibon et al. (2004). Na fração insolúvel foi adicionado 1000  $\mu\text{L}$  de ETOH 100%, seguida de centrifugação a 14000 rpm a 4°C por 10 m. Após o descarte do sobrenadante e nova centrifugação a 14000 rpm a 4°C por 5 m, foi adicionado às amostras uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 M sendo incubadas por 1h a 95°C sob agitação contínua a 450 rpm. A concentração total de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), e sendo os resultados expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  MS.

### *2.7 Aminoácidos totais*

Para obter a concentração de aminoácidos totais livres foi retirada uma alíquota de 5  $\mu\text{l}$  da fração etanólica solúvel obtida durante o processo de extração das amostras. Esta alíquota foi utilizada para montagem do meio de reação constituído de 45  $\mu\text{L}$  de ETOH 70%, 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato (Na-Citrato 1M + 0,2% de ácido ascórbico, pH 5,2), e 100  $\mu\text{L}$  de nihidrina 1% (em ETOH 70%). A reação foi incubada por 20 min a 95°C protegida de iluminação. A concentração de aminoácidos totais livres foi calculada a partir de uma curva padrão de leucina, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS.

### *2.8 Concentração de amido*

A análise de quantificação de amido foi obtida a partir da fração insolúvel da extração etanólica, após adição de NaOH 0,1 M (Fernie et al. 2001). A cada amostra, foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial 1 M. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 m. Para a degradação do amido foram utilizados 60  $\mu\text{l}$  do mix de digestão contendo as enzimas amiloglicosidade e  $\alpha$ -amilase, tampão acetato de sódio (0,5 M pH 4,9) e 40  $\mu\text{L}$  da amostra neutralizada com ácido acético glacial. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 1h a 55 °C, sob agitação

constante a 500 rpm. A leitura foi realizada com 10  $\mu\text{L}$  da amostra, 160,7  $\mu\text{L}$  do mix de quantificação contendo tampão HEPES/ KOH (1 M pH 7,0 +  $\text{MgCl}_2$  30 mM), ATP (109 mM,  $\text{NADP}^+$  48,3 mM, e G6DPH II), e 3  $\mu\text{L}$  de hexocinase em uma cinética de 120 minutos a 340 nm. A concentração de amido foi obtida pelo valor da quantidade de glicose degradada expressa em  $\mu\text{mol}$  de amido  $\text{g}^{-1}$  MS.

### *2.9 Concentração de clorofilas totais*

Na determinação de clorofilas foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de ETOH 98% e 15  $\mu\text{L}$  do Mix de ETOH (ETOH 95, 80, 50 % 1:1:1) a 35  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico solúvel. A leitura foi realizada a 645 e 665 nm, sendo o cálculo de Chl  $a= 5,21* \text{abs } 665\text{nm} - 2,07* \text{abs } 645 \text{ nm}$  e Chl  $b= 9,29* \text{abs } 645 \text{ nm} - 2,74* \text{abs } 665 \text{ nm}$  (Gibon et al. 2004; Sulpice et al. 2009).

### *2.10 Concentração de açúcares*

Para a determinação de glicose, frutose e sacarose foi utilizada a metodologia proposta por Fernie et al. (2001). Alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico solúvel foram adicionadas a 160  $\mu\text{L}$  do mix de quantificação (tampão HEPES /KOH 1 M +  $\text{MgCl}_2$  30 mM, ATP 109 mM,  $\text{NADP}^+$  48,3 mM, e G6DPH II), e 10  $\mu\text{L}$  de ETOH 80%. A leitura foi realizada a 340 nm até estabilização da linha de base de acordo com a adição das enzimas hexocinase, fosfoglicose isomerase e invertase. O cálculo foi obtido através da equação  $\Delta\text{OD} / (2,85*6,22)$ , e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$   $\text{g}^{-1}$  MS.

### *2.11 Análises de anatômicas e histoquímicas*

Avaliações relativas a organização estrutural, celular, espessura e número de células foram realizadas em cortes anatômicos obtidos da região mediana do caule, do segmento da raiz principal (2 cm) e da porção mediana do folíolo central da folha mais jovem completamente expandida. Em seguida, as amostras foram fixadas em formaldeído:ácido acético 50% (FAA<sub>50</sub>) por 48 h e estocadas em etanol 70 % (Johansen, 1940). Os materiais vegetais foram posteriormente incluídos em metacrilato (Leica Historesin<sup>®</sup> Plus), de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes transversais de

5  $\mu\text{m}$  de espessura da folha, caule e raiz foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA), e depositados em lâminas de vidro. Os materiais seccionados foram corados com solução de azul de toluidina a 0,05% em pH 4,0 (O'Brien et al. 1964), sendo em seguida lavados em água corrente.

As imagens para análise quantitativa dos cortes anatômicos foram obtidas por câmera fotográfica digital (modelo Moticam 580 5.0 MP, Motic, Hong Kong) acoplada ao microscópio óptico (modelo LOTUS MCX51, Micros, Austria). Após obtenção das imagens foram avaliados os parâmetros quantitativos com o programa Image-Pro Plus<sup>®</sup>: de área (espaço intercelular) e de espessura: na folha (faces abaxial e adaxial, mesofilo, parênquima paliçádico e esponjoso); no caule (xilema, parênquima fundamental, colênquima, câmbio vascular, esclerênquima); e na raiz (epiderme, córtex, diâmetro do cilindro vascular). Adicionalmente, foi realizado a contagem do número de células a partir da padronização de uma área conhecida de 100  $\mu\text{m}^2$  relativo ao número de células do parênquima, colênquima e esclerênquima no caule.

Cortes transversais dos órgãos vegetais foram realizados a fresco e à mão livre, corados de acordo com os compostos de interesse que se pretendia identificar. Para análise histoquímica de compostos de celulose, como  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 glucanos, polissacarídeos carboxilados e calose foi utilizada a solução de Calcofluor White Stain 0,01% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) de acordo com metodologia proposta por Hughes & McCully (1975). Cortes à mão livre foram realizados no caule e raízes, e posteriormente corados por 20 s com a solução de Calcofluor. As imagens para análise estrutural qualitativa foram obtidas com objetiva de 4x através da câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) acoplada ao microscópio óptico (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Na análise histoquímica para detecção de ligninas, foi utilizado o método de coloração de com floroglucina ácida (Johansen 1940). Seções transversais da folha, caule e raiz foram cortados a fresco. Os tecidos cortados foram colocados em contato por 5

minem duas soluções: uma de floroglucina 2% em ácido clorídrico 25% e a outra de ácido clorídrico 25%. As imagens para análise estrutural qualitativa da composição de lignina foram obtida com objetivas de 5, 10 e 20x através de câmera digital fotográfica (modelo Zeiss AxioCam 105 color - Z, Göttinger, Germany) acoplada ao microscópio óptico (modelo Zeiss – Scope A1, Olympus Optical, Tokyo, Japan) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

### *2.12 Isolamento de parede celular*

O isolamento de parede celular foi realizado de acordo com Acker et al. (2013) em amostras de 15 mg compostas por caule e folha liofilizadas. Foram adicionados às amostras 1000 µl dos solventes em cada etapa de extração MQ-H<sub>2</sub>O 98° C, de ETOH 100 % 76° C, clorofórmio 59° C, e acetona 100% 54° C, respectivamente. O resíduo da parede celular obtido ao final dos processos de extrações foi seco em evaporado rotativo à vácuo por 8h. Em seguida o material foi submetido ao processo de hidrólise do amido (Ferne et al. 2001), e posterior lavagem do pellet formado com ETOH (70%). Após uma última foi secagem em evaporado rotativo à vácuo por 4h foi obtido a parede celular isolada.

No material foi realizado uma nova extração para remoção de hemicelulose, adicionando 1000 µL de ácido trifluoroacético 2M à parede celular que foi incubada por 2h a 99° C a 750 rpm. O sobrenadante foi retirado e ao pellet formado foram realizadas três lavagens sucessivas adicionando 1000 µL MQ-H<sub>2</sub>O com centrifugações a 10000 rpm, a 4° C por 10 min, entre elas. O pellet purificado foi lavado com 1000 µL de acetona e centrifugado a 14000 rpm a 4° C por 3 min. A parede celular isolada para quantificação de celulose e lignina foi obtida após secagem do material extraído em evaporador rotativo à vácuo.

### *2.13 Quantificação de celulose e lignina*

A quantificação de celulose foi realizada de acordo com Acker et al. (2013). Em média 5 mg de parede celular isolada das amostras foram incubadas com 1000 µL de ácido sulfúrico 100% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 1h a 90°C, sob agitação constante a 500 rpm. Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 14000 rpm por 5 min a 4°C. Com

a formação de fases, foram retiradas alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes e adicionados 150 µL de ácido sulfúrico 100%, e 30 µL de fenol 5% para realizar a reação. As amostras foram incubadas por 5 min a 90°C, sob agitação constante a 500 rpm, sendo sequencialmente resfriadas em banho de gelo. A leitura foi realizada a 493 nm em alíquotas de 100 µL retiradas dos meios de reação. A quantificação de celulose foi feita com base na massa da parede celular utilizada e a equação gerada a partir de um padrão de celulose (Sigma-Aldrich®).

A quantificação de lignina foi conduzida através da versão modificada do método do brometo de acetila (Foster et al. 2010; Acker et al. 2013). Após a purificação da parede celular, aproximadamente 6 mg do material foi dissolvido em 100 µL de brometo de acetila 25% (diluído em ácido acético glacial). Em seguida 4 µL de ácido perclórico 60% foi adicionado à solução e incubado por 30 min a 70° C, sob agitação constante a 850 rpm. O material foi posteriormente centrifugado a 14000 rpm por 15 min a 4°C, sendo ao final da centrifugação adicionado 1000 µL de ácido acético glacial. Como produto da diferenciação das fases, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, enquanto os pellets foram lavados com NaOH e ácido acético com nova centrifugação de 14000 rpm a 4°C por 15 min.

O volume final foi ajustado para 2 mL com ácido acético, e o material foi mantido em temperatura ambiente por 20 min até a leitura. O teor de lignina foi determinado em 200 µL/ poço pela leitura da absorbância a 280 nm em leitor de placas UV. O coeficiente utilizado para determinar a porcentagem de lignina solúvel em brometo de acetila na soja foi com base no coeficiente de determinação de *Arabidopsis* (15,69 g<sup>-1</sup>) (Vogel 2008; Foster et al. 2010). O cálculo de lignina foi feito de acordo com a concentração de lignina solúvel em brometo de acetila, em que:  $Lignina = [Abs / (coeficiente \times comprimento \text{ de percurso da placa})] \times [(2 \text{ ml} \times 100\%) / peso (mg)]$ , onde; a concentração de lignina é dada em µg mg<sup>-1</sup> de parede celular.

#### 2.14 Análise de expressão

Amostras compostas do caule e do trifólio foram coletadas, maceradas e homogeneizadas em TRIzol® (ThermoFisher scientific) para isolar o RNA de acordo com recomendações do fabricante. Posteriormente, em média 10 µg RNA isolado foi

adicionado DNase I (Invitrogen<sup>®</sup>) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade e qualidade da amostra de RNA foram determinadas utilizando Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA com Super Script<sup>™</sup> III, First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). A corrida de RT-qPCR foi realizada no equipamento CFX96 Touch<sup>™</sup> (BIO-RAD), utilizando SYBR Green I (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA). O perfil de expressão gênica foi normalizado através do gene *Gmβ-actina* (F5' -TGGACTCTGGTGTGGTGTG-3' e R5'-CTCAGCAGAGGTGGTGAACA-3') como controle endógeno (Li et al. 2015), sendo calculado os níveis relativos de expressão de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de acordo com metodologia de Livak & Schmittgen (2001). Os primers de genes específicos para biossíntese de celulose e lignina na parede celular da soja desenhados foram: foram *Gm4CL* (F5'-CAGCTTCAGAGGGGTAGTGC-3' e R5'-CAGCGCCAGAACCAATATGC-3'), *GmCCoAOMT* (F5'-GGCTGGTGTAGAGCACAAGA-3' e R5'TATCGGCATCAACGAAGGCA-3'), *GmCESA8* (F5'-TCAAAGGTCTCATGGGTCGC-3' e R5'-TATGGCAATGCAGGTCTCGG-3'), e *GmCESA7* (F5'-TGGTCGCTGGGTCACATAAC-3' e R5'-CCACACTCATTGCAAGCCAC-3'). As médias foram comparadas pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ).

Gene	Nome	Reação catalisada	Função
<i>Gm 4CL</i>	Glycine max 4-coumarate-CoA ligase-like 7-like	ATP + 4-coumarate + CoA AMP + diphosphate + 4-coumaroyl-CoA	CoA ligase que representa a enzima de ponto de ramificação do metabolismo da rota de fenilpropanóides na planta, catalisando a ativação do ácido 4-coumárico e vários outros derivados do ácido cinâmico hidroxilado e metoxilado aos ésteres de CoA correspondentes em uma reação em duas etapas.
<i>Gm CCoAO MT</i>	Glycine max probable caffeoyl-	S-adenosyl-L-methionine + caffeoyl-CoA = S-adenosyl-L-	Proteínas envolvidas na biossíntese da via fenilpropanóide, que faz parte

	CoA O-methyltransferase At4g26220-like	homocysteine + feruloyl-CoA	do metabolismo do composto aromático.
<b>Gm CesA7</b>	Glycine max cellulose synthase A catalytic subunit 7	UDP-glucose + (1,4- beta-D-glucosyl)(n) =	Subunidade catalítica de complexos terminais de celulose sintase ("rosetas"), necessária para a cristalização de microfibrilas beta- 1,4-glucanas, um dos principais mecanismos de formação da parede celular. Envolvido na formação da parede celular secundária. Necessário para o espessamento da parede celular do xilema
<b>Gm CesA8</b>	Glycine max cellulose synthase A catalytic subunit 8	UDP + (1,4-beta-D- glucosyl)(n+1)	

### 2.15 Análise estatística e design experimental

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com uma cultivar UFVS 86B10, um período de aplicação dos tratamentos (estádio vegetativo V3) e quatro tratamentos (controle, GA<sub>3</sub>, PAC, e PAC + GA<sub>3</sub>) com 10 repetições, totalizando 40 unidades experimentais. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) para comparação das médias dos tratamentos através do Software Genes (Cruz, 2013).

## 3 Resultados

### 3.1 GA<sub>3</sub> e PAC alteraram o crescimento e o acúmulo de biomassa na raiz, no caule e nas folhas

O crescimento da parte aérea de plantas de soja foram modificados após tratamento com GA<sub>3</sub>, PAC e PAC + GA<sub>3</sub> sendo o maior comprimento obtido com GA<sub>3</sub> e o menor com PAC (Figura 1). O tratamento com PAC reduziu em 55,6% o comprimento do caule, por outro lado, a aplicação de GA<sub>3</sub> induziu aumento de 64,2%, comparado à

média do controle (Figura 2A). Mesmo com o efeito inibitório do PAC, a presença de PAC+GA<sub>3</sub> permitiu a retomada de crescimento do caule (Figura 2A). Embora o crescimento do caule tenha sido alterado em comprimento, não foram observadas diferenças no diâmetro do caule (Figura 2B), nem no comprimento da raiz (Figura 2C).

A massa seca total da planta e a matéria seca de folhas não diferiram entre os tratamentos (Figura 3A e C). Por outro lado, foram observadas alterações na alocação de biomassa no caule e na raiz (Figura 3B e D). A aplicação de GA<sub>3</sub> aumentou em 36,4% a biomassa do caule. Já o tratamento com PAC induziu 40% de redução no peso seco do caule, mas quando aplicado em conjunto com GA<sub>3</sub> induziu a redução de biomassa na região, conferindo um maior acúmulo de massa. O peso seco da raiz mostrou ter sido apenas no tratamento com PAC o incremento de massa no órgão.

A taxa de crescimento relativo aumentou em soja após os tratamentos GA<sub>3</sub> e PAC+GA<sub>3</sub> (Figura 4A). Os resultados da fração de massa foliar, radicular e caulinar (Figura 4B, C e D) seguiram a mesma tendência das médias obtidas na quantificação da massa seca nestes órgãos (Figura 3C, D e B). A razão entre a biomassa acumulada na parte aérea e nas raízes reduziu apenas no tratamento com PAC (Figura 4E). Os demais tratamentos não influenciaram nesta relação, e mantiveram a proporção (maior que 1) de massa seca alocada na parte aérea maior que na raiz. Medidas da área foliar e da área foliar específica foram reduzidas após tratamento com PAC (Figura 4F e G). Adicionalmente, a aplicação de GA<sub>3</sub> e de PAC + GA<sub>3</sub> também reduziu a área foliar específica com relação ao controle (Figura 4G).

### *3.2 Alteração dos níveis de GAs, modificou a organização morfo-anatômica em folha, caule e raiz de soja*

Em folhas, a aplicação de GA<sub>3</sub> induziu redução no tamanho das células do limbo foliar, refletindo em aumento no espaço entre as células (Figura 5E). Após aplicação dos tratamentos, não houve alteração na espessura da epiderme abaxial e adaxial, e nem na espessura do parênquima paliçádico (Figura 5F, H e I). Contudo, a presença de PAC resultou em aumento na espessura do mesofilo e do parênquima esponjoso (Figura 5G e

J). Já na presença de GA<sub>3</sub> houve redução na espessura do parênquima esponjoso (Figura 5J).

As medidas realizadas para verificação da espessura do xilema indicaram em caule que GA<sub>3</sub> e PAC + GA<sub>3</sub> foram os tratamentos responsáveis por induzir o maior desenvolvimento desta região, seguido pelo tratamento com PAC (Figura 6B, C, D e E). O GA<sub>3</sub> também aumentou a espessura do esclerênquima (Figura 6F e J). Já a espessura do câmbio vascular do caule aumentou apenas com a aplicação de PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 6I). Apesar de haver diferenças na espessura do parênquima e esclerênquima (Figura 6F e J), não foram observadas alterações em relação ao número de células em nenhum dos tecidos analisados (Figura 6H, K e L).

Em raízes, a espessura da epiderme radicular não apresentou alterações após a aplicação dos tratamentos (Figura 7E). Por outro lado, a espessura do córtex da raiz e o diâmetro do cilindro vascular reduziram após a aplicação dos tratamentos, principalmente com GA<sub>3</sub> (Figura 7F e G).

### *3.3 Regulação hormonal de GAs por PAC induziu aumento nas trocas gasosas e maior eficiência na fluorescência da clorofila a*

A aplicação de PAC e PAC+GA<sub>3</sub> induziu melhor rendimento na fotossíntese líquida, sendo 19,62 e 8% maior que o tratamento controle, respectivamente (Figura 8A). Para os outros parâmetros avaliados, concentração interna de CO<sub>2</sub>, razão Ci/ Ca, eficiência fotoquímica máxima do FSII, condutância estomática, taxa transpiratória e respiração no escuro, não houve variação após aplicação dos tratamentos (Figura 8B-G).

De acordo com os resultados de fluorescência da Chl *a*, o tratamento com PAC, seguido pelo tratamento com GA<sub>3</sub> resultaram em melhor rendimento fotoquímico via qP durante toda a curva de indução (Figura 9A). Entretanto, quando aplicados juntos (PAC+GA<sub>3</sub>) apresentaram menores valores de qP. Este mesmo padrão de resposta foi obtido para os parâmetros na taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 9B) e rendimento quântico do ΦPSII (Figura 9C). Já os resultados do NPQ evidenciaram melhor resposta para o tratamento com GA<sub>3</sub> seguido do tratamento com PAC+GA<sub>3</sub> (Figura 9D).

### *3.4 Regulação dos níveis de GAs induziu respostas distintas no metabolismo primário*

Apenas o teor de proteínas totais não apresentou diferenças entre os tratamentos (Figura 10A). A concentração de aminoácidos totais foi alterada apenas no tratamento com PAC, apresentando aumento de 64% em relação ao controle (Figura 10E). O conteúdo de amido foi reduzido em todos os tratamentos com GA<sub>3</sub> (Figura 10B). Para os níveis de açúcares o tratamento com PAC foi responsável por aumentar a concentração de sacarose (Figura 10F), e reduzir a concentração de frutose e glicose (Figura 10C e D). Já o tratamento com GA<sub>3</sub> induziu resposta contrária, reduzindo sacarose e aumentando frutose e glicose. Adicionalmente, o tratamento com PAC+GA<sub>3</sub> permitiu aumento nos níveis de frutose e glicose. Quanto à Chl total, apenas o tratamento com PAC permitiu aumento nos teores desse composto (Figura 10G).

### *3.5 GA<sub>3</sub> e PAC induziram mudanças na localização e na biossíntese de celulose e lignina na parede celular*

Para avaliar a localização e a composição de lignina na folha, caule e raiz, cortes transversais desses órgãos foram avaliados com o corante Floroglucina ácida (Figura 11 A-L). A coloração vinho releva reação positiva para as estruturas compostas por lignina. Para folhas, é possível visualizar que o tratamento com GA<sub>3</sub> teve maior número de células lignificadas nas regiões do xilema, periciclo e endoderme (Figura 11B). O mesmo efeito foi evidenciado, porém com menor intensidade na coloração, na nervura mediana de folhas tratadas com PAC+GA<sub>3</sub> (Figura 11D). O tratamento com PAC interferiu em menor número de células lignificadas na região do periciclo e endoderme (Figura 11C).

Para o caule, as principais regiões coradas foram o xilema e as células esclerenquimáticas. O tratamento com GA<sub>3</sub> induziu maior formação de células do esclerênquima com lignina (Figura 11B). Por outro lado, ao visualizar a região de coloração no sistema vascular, é possível observar que o xilema possui menor espessura de células lignificadas do que os demais tratamentos (Figura 11A-D). Já o tratamento com PAC, promoveu efeitos distintos na lignificação do caule comparado ao GA<sub>3</sub>, como menor número de células esclerenquimáticas lignificadas (Figura 11C). O tratamento com PAC + GA<sub>3</sub> apresentou semelhança ao efeito isolado da aplicação do PAC na formação

de células lignificadas no esclerênquima e no xilema (Figura 11D). Na raiz não foi observado diferença na composição da parede celular após aplicação dos tratamentos.

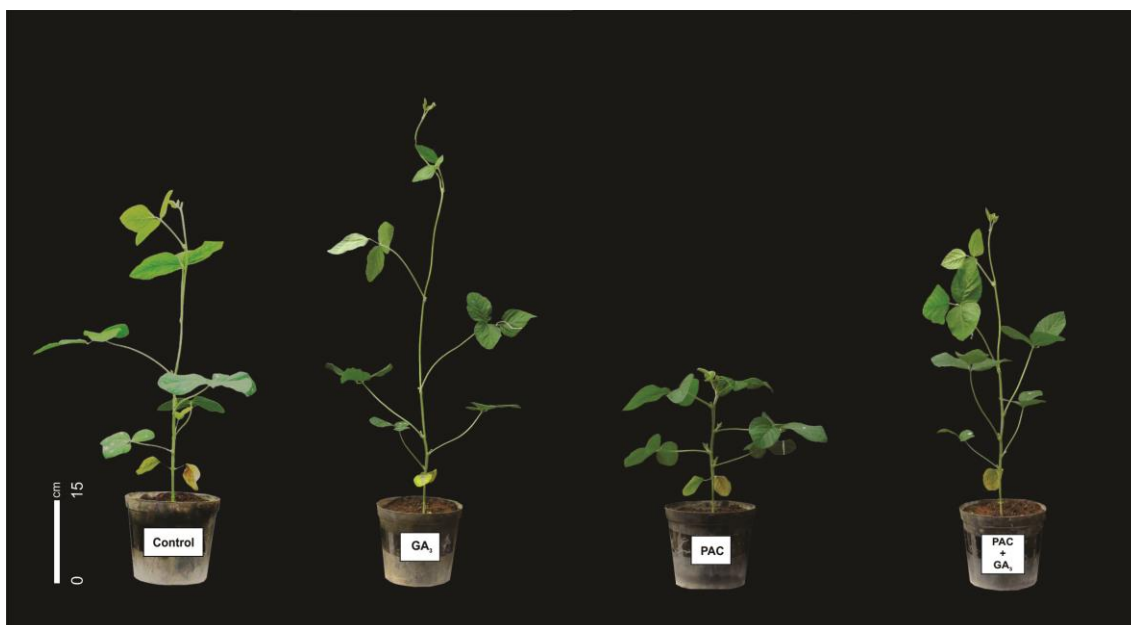
A redução dos níveis de GAs no tratamento com PAC induziu aumento na concentração de celulose na parte aérea de plantas de soja (Figura 11M). Contudo, essa resposta não foi observada quando aplicado em conjunto com GA<sub>3</sub> no tratamento PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 11M). Por outro lado, a aplicação de GA<sub>3</sub>, alterou negativamente a concentração de celulose no tratamento isolado, e provavelmente foi o responsável pela redução no tratamento com PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 11M).

A concentração de lignina na parede celular foi alterada de maneira distinta entre os tratamentos. O PAC promoveu redução nos níveis de lignina na parte aérea de soja (Figura 11O). Já os tratamentos GA<sub>3</sub> e PAC + GA<sub>3</sub> foram responsáveis pela maior elevação no conteúdo de lignina (Figura 11O). O conteúdo de lignina na composição de plantas tratadas com GA<sub>3</sub> foi maior em relação às plantas controle e as tratadas com PAC. A relação entre o conteúdo de celulose e de lignina na parte aérea foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos (Figura 11N). Os resultados evidenciaram que plantas tratadas com PAC apresentaram a maior parte da composição da parede celular composta por celulose do que de lignina, sendo esta proporção muito maior do que as dos demais tratamentos. A proporção de celulose e lignina na composição da parede celular dos tratamentos com GA<sub>3</sub> e PAC + GA<sub>3</sub> revelam existir um balanço entre estes dois compostos, sendo esta característica similar à condição controle (Figura 11O).

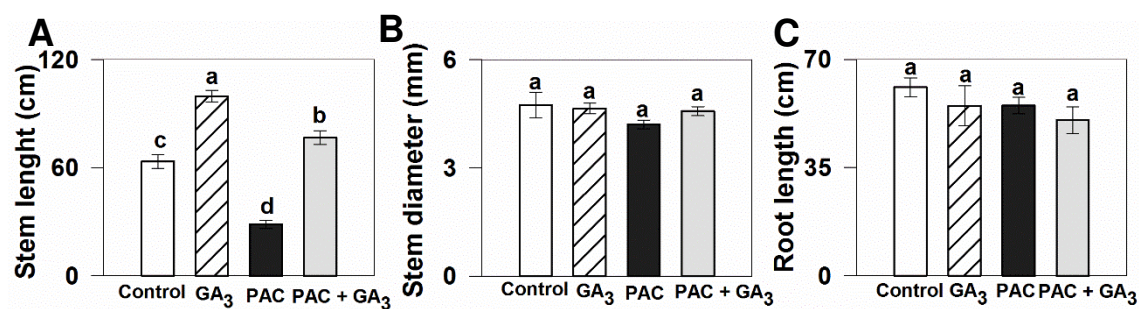
### *3.6 Gm4CL apresentou variação na expressão após aplicação de GA<sub>3</sub> e PAC*

A expressão relativa do *Gm4CL*, que é um intermediário da rota de biossíntese de lignina, mostrou que os tratamentos influenciaram a regulação dessa via, uma vez que tanto as plantas tratadas com PAC quanto as com GA<sub>3</sub> reduziram significativamente a expressão desse gene em relação ao controle (Figura 13A). Para a expressão do gene *GmCCoAOMT*, relacionado a via principal de biossíntese de lignina, não houve diferenças de expressão entre os tratamentos (Figura 13B).

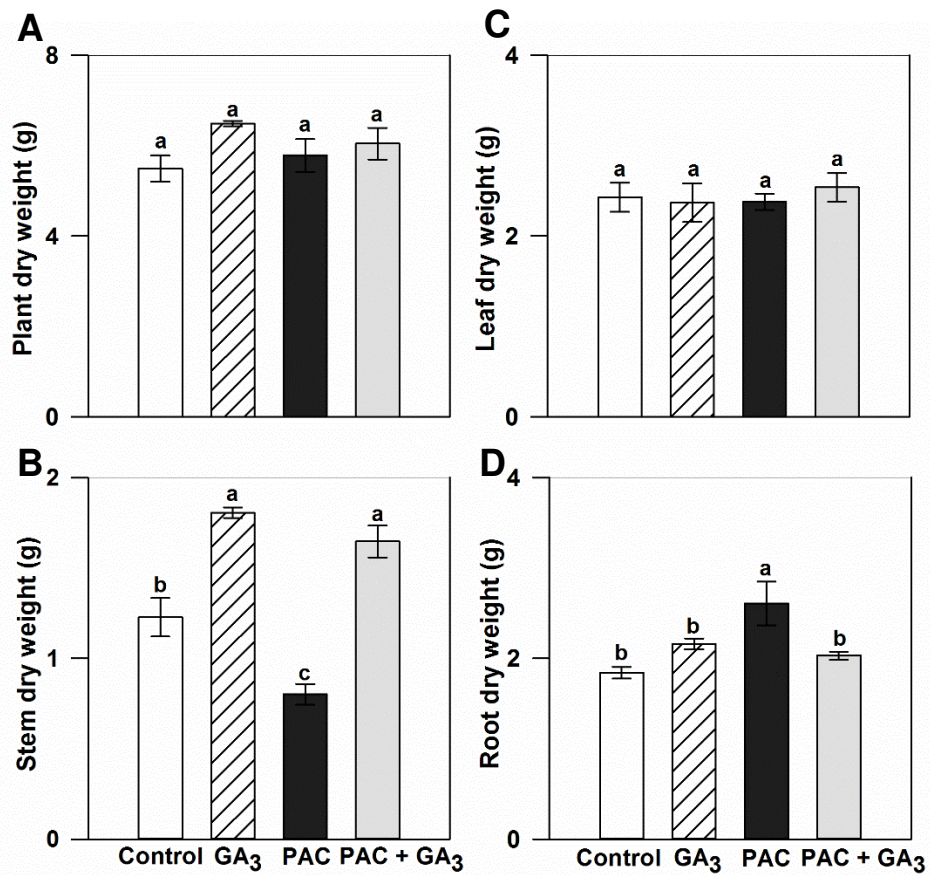
#### 4 Figuras capítulo 1



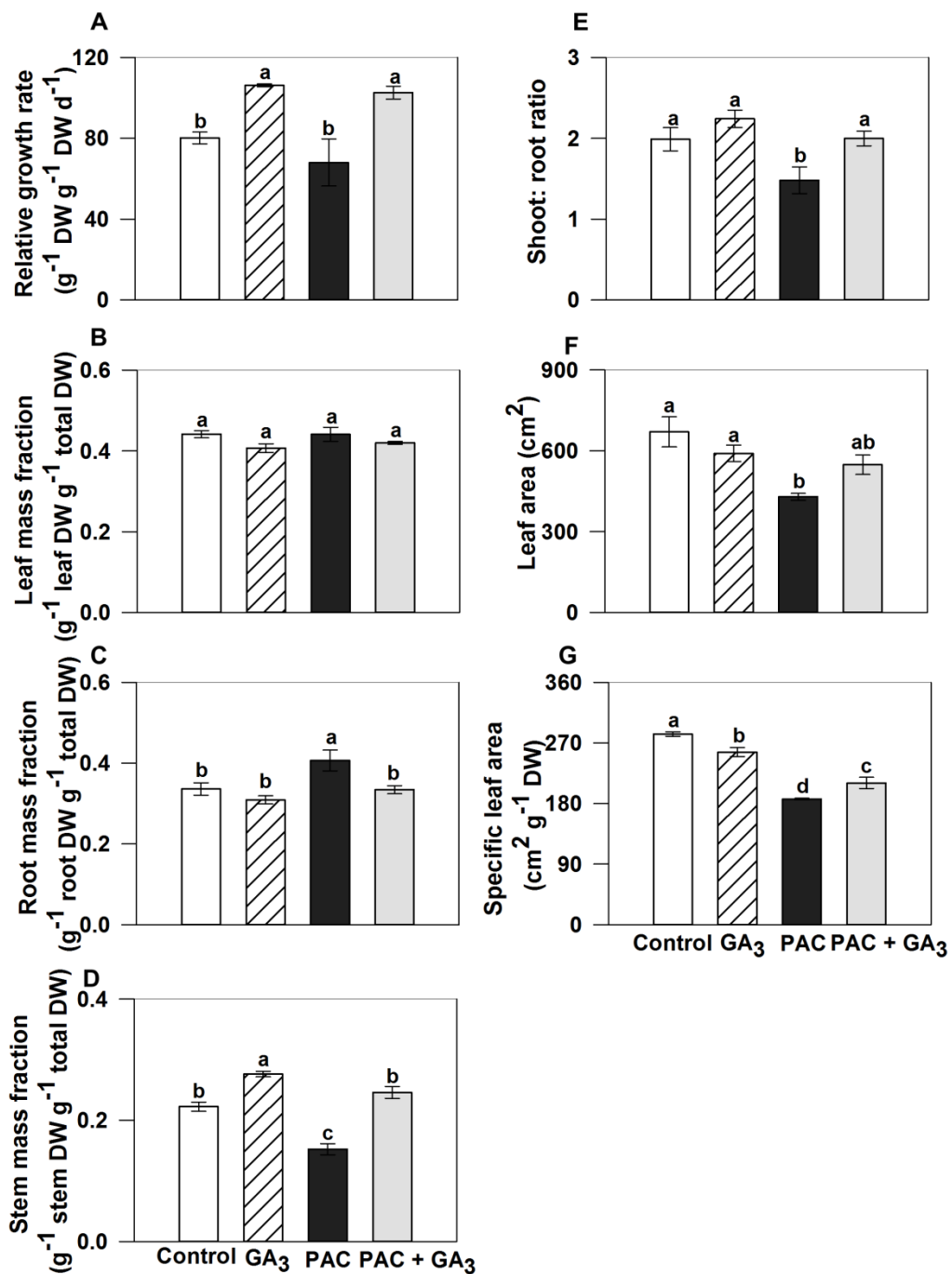
**Figura 1.** Variação no crescimento e desenvolvimento da parte aérea em soja após tratamento com GA<sub>3</sub> e PAC. Para induzir a variação nos níveis de GAs foram aplicados: água (controle), 50 μM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000 μM de paclobutrazol (PAC), 50 μM de ácido giberélico + 1000 μM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>).



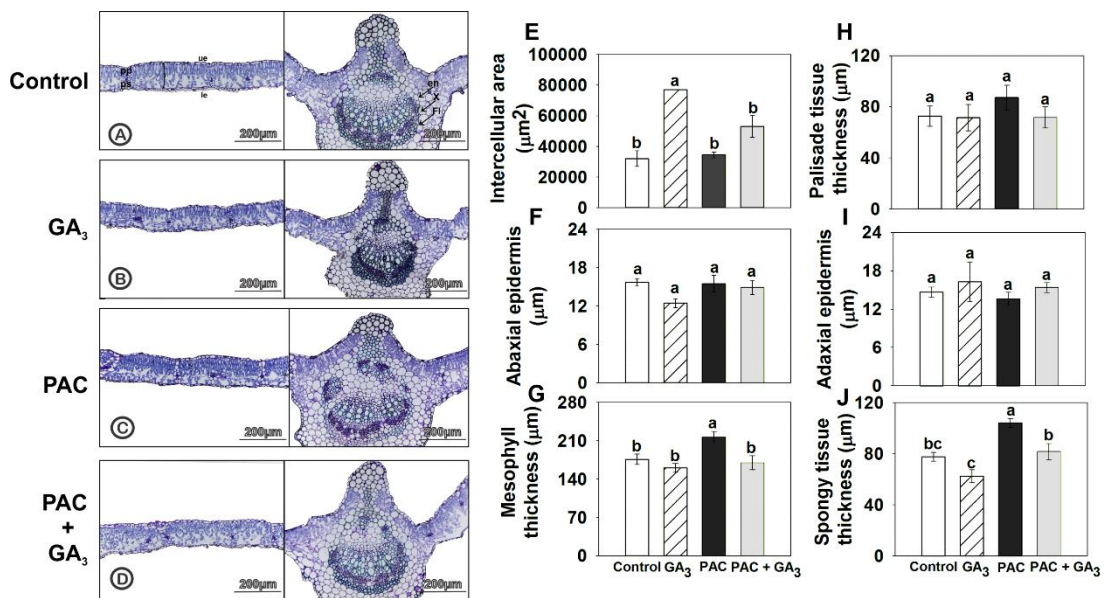
**Figura 2.** Comprimento do caule (A), diâmetro do caule (B) e comprimento da raiz (C) em soja após tratamento com água (controle), 50 μM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000 μM de paclobutrazol (PAC), 50 μM de ácido giberélico + 1000 μM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n = 4$ ).



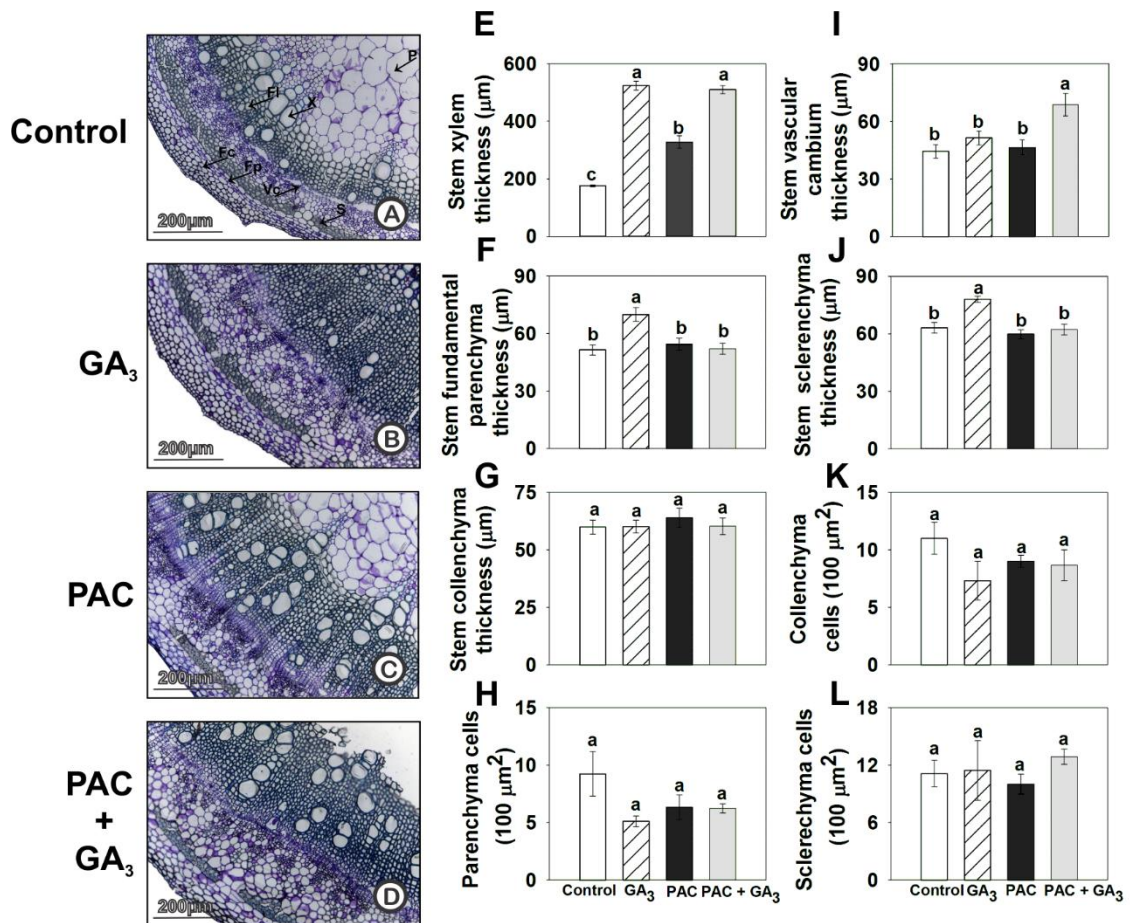
**Figura 3.** Avaliação do peso seco da planta (A), do caule (B), da folha (C) e da raiz (D) de soja após tratamento com água (controle), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n = 4$ ).



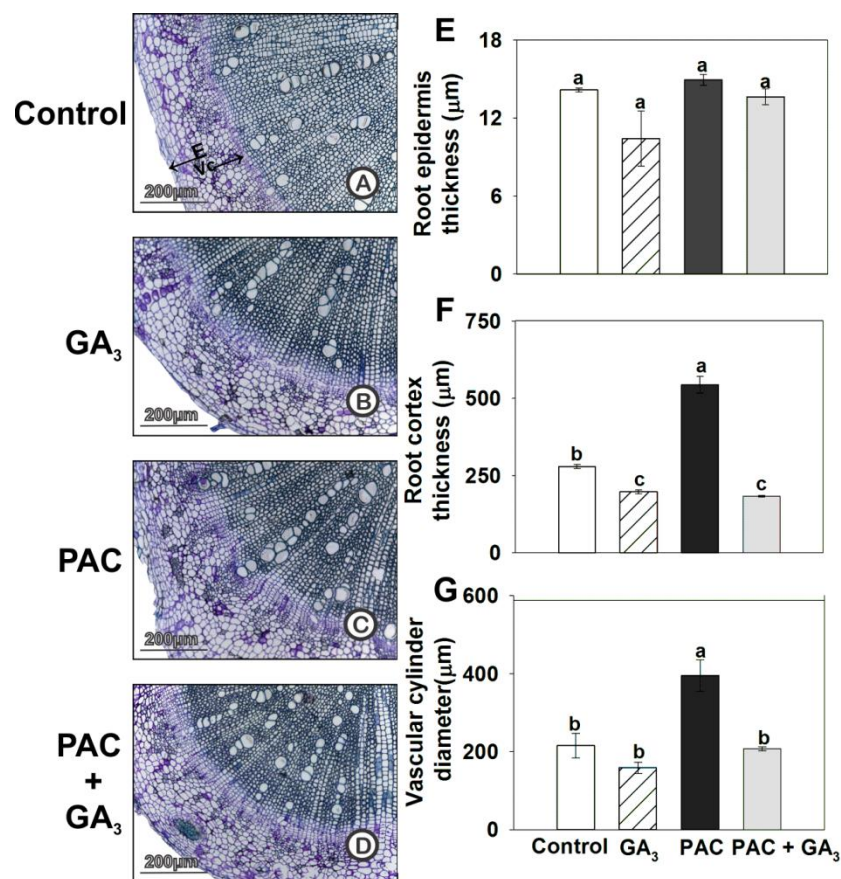
**Figura 4.** Taxa de crescimento relativo (A), fração de biomassa foliar (B), radicular (C) e caulinar (D), razão parte aérea:raiz (E), área foliar (F) e área foliar específica (G) em soja após tratamento com água (controle), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+ $\text{GA}_3$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n = 4$ ).



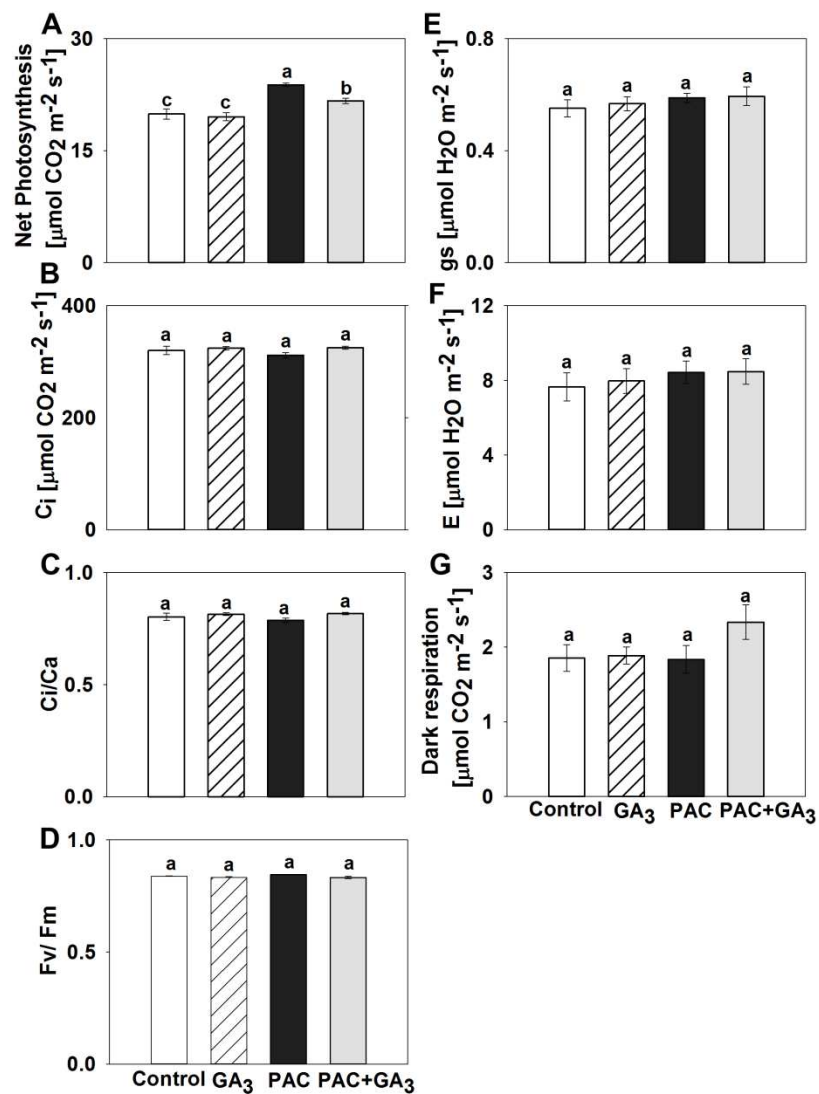
**Figura 5.** Anatomia foliar e análise quantitativa dos cortes anatômicos em soja após tratamento com água (controle), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+ $\text{GA}_3$ ). A-D: limbo e a nervura foliar mediana corada com azul de toluidina 0,05%; E-J: medidas de área e de espessura das estruturas do limbo foliar. Legenda: pp, parênquima paliçádico; ps, parênquima esponjoso; ue, epiderme abaxial; le, parênquima esponjoso; x, xilema; fl, floema; en, endoderme. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n=3$ ).



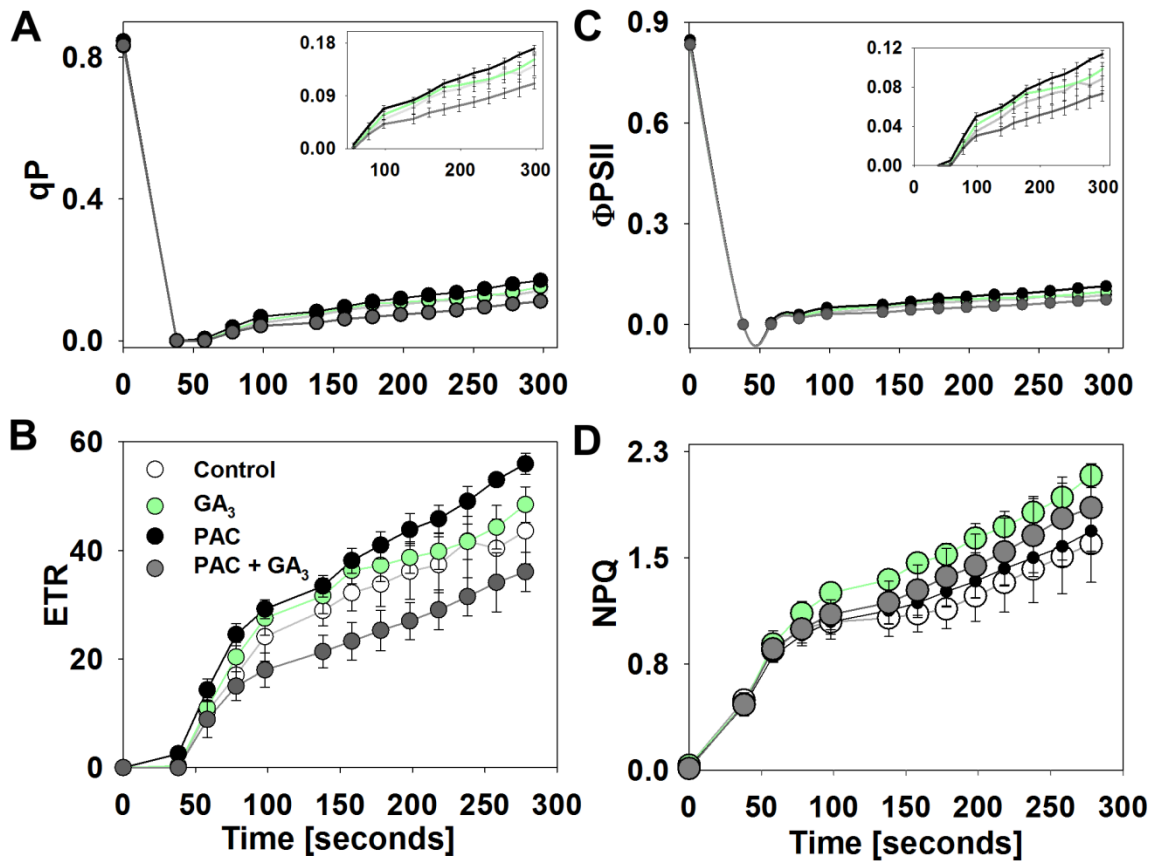
**Figura 6.** Anatomia do caule e análise quantitativa dos cortes anatômicos em soja após tratamento com água (controle), 50 μM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000 μM de paclobutrazol (PAC), 50 μM de ácido giberélico + 1000 μM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A-D: cortes transversais do caule corados com azul de toluidina 0,05%; E-L: medidas de espessura e contagem do número de células no caule. Legenda: P, parênquima da medula do caule; X, xilema; Fl, floema; S, esclerênquima; Vc, câmbio vascular; Fp, células do parênquima fundamental; Fc, células do colênquima fundamental. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n=3$ ).



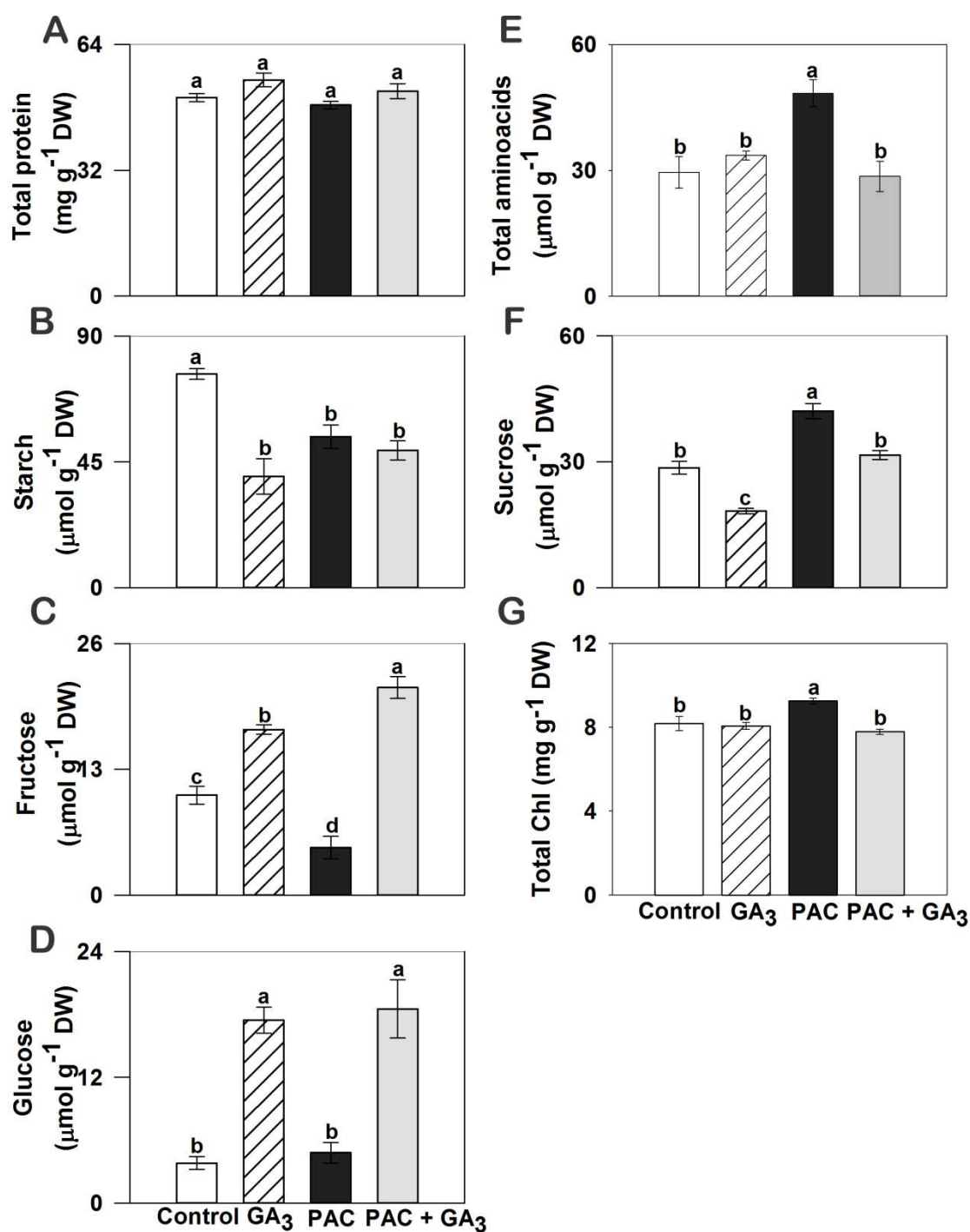
**Figura 7.** Anatomia da raiz e análise quantitativa dos cortes anatômicos em soja após tratamento com água (controle), 50 µM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000 µM de paclobutrazol (PAC), 50 µM de ácido giberélico + 1000 µM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A-D: cortes transversais da raiz principal corados com azul de toluidina 0,05%; E-G: medidas de espessura e contagem do número de células na raiz. Legenda: Vc, câmbio vascular. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) (n=3).



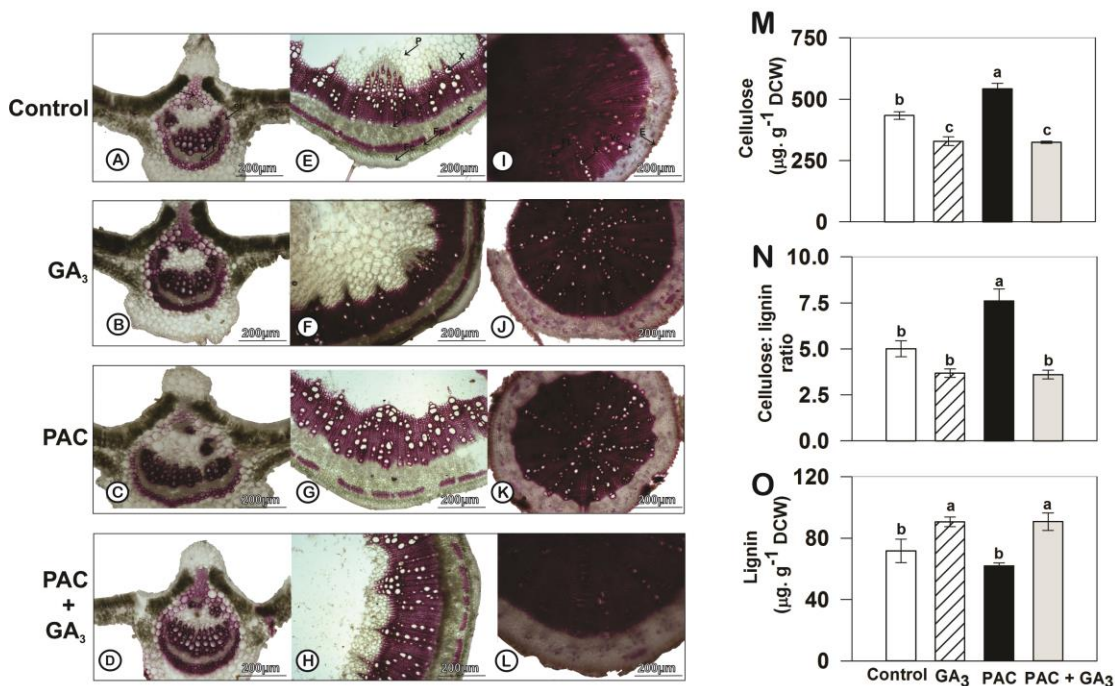
**Figura 8.** Parâmetros fotossintéticos em soja após tratamento com água (controle), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 1000  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A); concentração interna de CO<sub>2</sub> (B); razão Ci/Ca (C); eficiência fotoquímica máxima do FSII (D); condutância estomática (E); transpiração (F) e respiração no escuro (G). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).



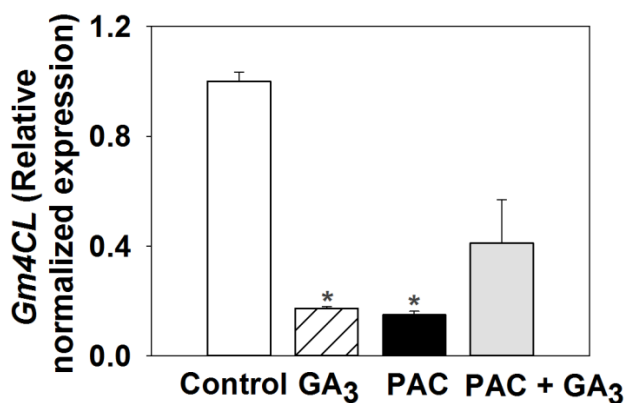
**Figura 9.** Parâmetros de fluorescência da Chl *a* gerados por curva de indução da fotossíntese em soja após tratamento com água (controle), 50  $\mu$ M de ácido giberélico ( $GA_3$ ), 1000  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC), 50  $\mu$ M de ácido giberélico + 1000  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC+ $GA_3$ ). A: *quenching* fotoquímico; B: taxa de transporte de elétrons no FSII; C: rendimento quântico do FSII; D: NPQ: *quenching* não-fotoquímico do FSII. Médias dos tratamentos são apresentadas em círculos juntamente com o erro padrão (n=13).



**Figura 10.** Metabolismo primário da parte aérea de soja após tratamento com água (controle), 50 μM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000 μM de paclobutrazol (PAC), 50 μM de ácido giberélico + 1000 μM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A: proteínas totais; B: amido; C: frutose; D: glicose; E: aminiácidos totais; F: sacarose; G: clorofilas totais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11.** . Histolocalização de lignina por microscopia de luz em folha, caule e raiz (A-D) de soja após tratamento com: água (controle), 50 μM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 1000 μM de paclobutrazol (PAC), 50 μM de ácido giberélico + 1000 μM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A-D: cortes transversais da nervura mediana da folha, caule e raiz, corados com Floroglucina ácida (coloração vinho indica reação positiva com o corante); M: análise do conteúdo de celulose na parede celular da parte aérea de soja. O: razão de celulose e lignina na parede celular. N: análise do conteúdo de lignina na parede celular. Legendas: folha- x, xilema; fp, parênquima fundamental; fc, colênquima; fl, floema; e, epiderme; en, endoderme; P, parênquima medular; p, periderme. vc, câmbio vascular; s, esclerênquima. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).



**Figura 13.** Análises da expressão relativa (RT-qPCR) do gene *Gm4CL* na biossíntese de lignina na parte aérea da soja após tratamento com: água (controle), 50  $\mu$ M de ácido giberélico ( $GA_3$ ); 1000  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC); 50  $\mu$ M de ácido giberélico + 1000  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC+ $GA_3$ ). Médias indicadas com asterisco diferem do tratamento controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

## 5 Discussão

Para melhor entendimento do processo morfofisiológico e molecular envolvido no acamamento da cultura da soja, o presente trabalho regulou os níveis do hormônio giberelina através da aplicação de  $GA_3$  e PAC que geraram modificações no crescimento e desenvolvimento da parte aérea, nos parâmetros fotossintéticos, nos metabólitos primários, teores de lignina e celulose e dos genes envolvidos na síntese desses dois compostos. Em outras espécies como milho (Kamran et al. 2018a), trigo (Peng et al. 2013; Kamran et al. 2018b) e pequenos cereais como *Eragrostis tef* e *Eleusine coracana* (Plaza-Wüthrich et al. 2016) já foi evidenciado a utilização do PAC na redução do comprimento médio do caule para o aumento da resistência física ao acamamento. Todavia, apesar desses trabalhos demonstrarem os efeitos ocasionados pela aplicação de PAC sobre o acamamento, informações relacionadas à cultura da soja são escassas. Adicionalmente, estes estudos avaliam apenas o efeito da aplicação do regulador sobre alguns aspectos gerais da cultura, sem avaliar respostas morfofisiológicas e moleculares envolvidas nesse processo (Sankhla et al. 1985; Cruciol et al. 2014; Mansour, 2014).

A aplicação de PAC para modulação do crescimento na soja induziu alterações na parte aérea, principalmente no caule. A redução dos níveis de GAs promoveu reduções no comprimento, no peso seco e na fração de biomassa acumulada no caule provavelmente, evidenciando sua ação inibitória sobre enzimas responsáveis por catalisar importantes etapas da biossíntese do hormônio. Por outro lado, não houve redução no diâmetro do caule após tratamento com PAC, sendo o aumento da espessura do caule uma importante característica fenotípica para manutenção do centro de gravidade e conseqüentemente menor incidência de acamamento (Kamran, et al. 2018a).

Outro resultado observado com a aplicação de PAC foi a redução na razão de biomassa entre parte aérea e raiz devido a menor biomassa acumulada no caule. Neste

trabalho, a aplicação de PAC+GA<sub>3</sub> foi capaz de reestabelecer o crescimento relativo, a expansão foliar e a porção de biomassa do caule, aumentando a proporção de biomassa na parte aérea em relação a raiz. A retomada do crescimento da parte aérea com aplicação de GA<sub>3</sub> em plantas tratadas com PAC, evidenciaram que a presença de GAs é necessária na conexão entre suprimento de energia metabólica e o crescimento (Ribeiro et al. 2012b). A redução dos níveis de GAs com aplicação de PAC resultou em menor área foliar total e específica, possivelmente pela menor taxa de expansão foliar (Stowe & Yamaki 1957; Hedden & Sponsel 2015).

Alterações na anatomia foliar mostraram que maiores níveis de GAs interferem na organização estrutural da folha através do aumento do espaço intercelular e menor espessura do mesófilo e do tecido esponjoso, uma vez que a maior espessura do mesófilo e do parênquima esponjoso induzem maior capacidade de absorção de energia luminosa por maior concentração de pigmentos fotossintéticos e melhor rearranjo estrutural (Falcioni et al. 2017). A organização anatômica das folhas e a maior concentração de Chl totais em soja tratada com PAC provavelmente induziu taxas fotossintéticas superiores.

Além das análises de crescimento e desenvolvimento da planta, a anatomia do caule se mostrou alterada com a aplicação de GA<sub>3</sub> induzindo maior crescimento secundário na região. Através de teste histoquímico foi possível observar que o GA<sub>3</sub> induziu maior composição com lignina em células esclerenquimáticas no caule e nos elementos de vasos do xilema no caule e na folha da soja. A concentração de lignina na parede celular foi superior nos tratamentos com GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub> e PAC+GA<sub>3</sub>) que resultou em feixes vasculares mais desenvolvido no caule, apesar da expressão relativa do gene envolvido no início da via de biossíntese dos fenilpropanóides *Gm4CL* ter sido significativamente reduzida. Na raiz não houveram modificações expressivas na análise estrutural e na histoquímica para detecção de lignina que sugerissem alterações relacionadas as maiores concentrações de GA<sub>3</sub> em soja. Diferentemente de Wang et al. (2017) que observaram aumento no desenvolvimento do xilema secundário radicular e maior lignificação em cenoura após aplicação de GAs.

As GAs são relatadas como sendo fito-hormônios necessários para induzir a diferenciação e o aumento no número de fibras do xilema no caule de espécies arbóreas

(Eriksson et al. 2000). No caso de plantas herbáceas como *Arabidopsis*, GAs são responsáveis pelo controle da diferenciação do xilema e na formação de fibras (Ragni & Greb 2017), e de acordo com os resultados observados neste trabalho a mesma função parece ser desempenhada na soja.

Antes da formação da parede secundária, a parede celular é composta por polissacarídeos como celulose e  $\beta$ -1,4-glucanos (Schneider et al. 2017). Os principais genes envolvidos na síntese de celulose para a formação da parede celular secundária em *Arabidopsis* são reconhecidamente *AtCesA8*, *AtCesA7* e *AtCesA4* (Tuner & Somerville 1997). Em soja, a aplicação de PAC não gerou diferenças significativas na análise de expressão relativa de alguns genes envolvidos na biossíntese de celulose, sugerindo que diferentemente de monocotiledôneas (Huang et al. 2015), a sinalização por GAs não interferem nos fatores de transcrição que iniciam a síntese de celulose. Pela análise histoquímica da celulose, plantas tratadas com GA<sub>3</sub> apresentaram maior fluorescência nas camadas dérmicas e nos raios dos feixes vasculares do que as raízes não tratadas. Em raízes de *Arabidopsis*, dentre os tecidos formados na zona de alongamento, a endoderme representa o tecido com maior dependência de GAs e requer a inibição de proteínas DELLA para indução do crescimento (Ubeda-Tomás et al. 2008).

As plantas têm desenvolvido processos adaptativos a incidência de acamamento através da organização da estrutura interna do caule e manutenção da pressão de turgor em órgãos lignificados (Gardiner et al. 2016). Angiospermas possuem estratégias de resistência estrutural como o desenvolvimento de tecidos e células específicas ao processo de crescimento (Shah et al. 2017). A importância da composição da parede celular durante o crescimento secundário pode ser observada em mutantes de *Arabidopsis* com *irregular xylem 3 (irx3)* por exemplo, que mesmo com produção de lignina durante o crescimento secundário, mas por serem deficientes na deposição de celulose, induzem o colapso dos vasos do xilema por não suportar forças de pressão negativas (Turner & Somerville 1997). Outro exemplo consiste no estudo de Xiao et al. (2017) com linhagens transgênicas de *Arabidopsis* com super-expressão de *POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2 (PGX2)* que ao apresentar fenótipos como o crescimento

do caule alongado, maior rigidez e composição de lignina na parede celular que induziram maior susceptibilidade ao acamamento do que em plantas selvagens.

Desta forma, a redução dos níveis de GAs por PAC poderia contribuir na formação da macro e micro estrutura do caule através do aumento da composição da parede celular por celulose, e não por lignina na soja (evidenciado com a aplicação de GA<sub>3</sub>). Köhler & Spatz (2002) observaram que maiores conteúdos de lignina podem não ser necessários, pois nem todos os tipos deste composto são relevantes para manutenção das propriedades mecânicas do caule. Uma vez que a composição da parede celular varia com a espécie, o tipo de tecido e desenvolvimento (Loqué et al. 2015) o aumento do conteúdo de celulose em plantas com níveis reduzidos de GAs na soja poderia aumentar a resistência ao acamamento tal como observado no trabalho de Wang et al. (2012) com trigo.

No metabolismo primário da soja baixos níveis de GAs via aplicação de PAC resultou em aumento no teor de aminoácidos e Chl total, mas a concentração de proteína não foi alterada. Este resultado pode ter sido ocasionado pelo aumento no conteúdo de nitrogênio para a parte aérea, tendo em vista seu papel na formação destes compostos (Ribeiro et al. 2012b). Provavelmente, maiores concentrações de aminoácidos totais em plantas tratadas com PAC são decorrentes da redução da parte aérea, pois o acúmulo de compostos de alta energia são energeticamente caros, desse modo se justifica a redução dos gastos em compostos de carbono para o crescimento (Ribeiro et al. 2012).

O crescimento é um processo que demanda maior disponibilidade de energia, desta forma o metabolismo de amido deve ser regulado de maneira equilibrada para que não ocorra estresse por sua indisponibilidade (Lastdrager et al. 2014). Em soja, é possível ocorrer modificações no armazenamento ou conversão dos produtos de armazenamento como o amido com flexibilidade na utilização de seus foto-assimilados (Stitt & Zeeman 2012). A concentração de amido na parte aérea da soja foi alterada com aumento ou redução nos níveis de GAs. A utilização desta energia de reserva poderia estar correlacionada com a maior produção de biomassa na parte aérea (plantas tratadas com GA<sub>3</sub>) ou na raiz (plantas tratadas com PAC). Esse resultado corrobora em parte com o relatado por Martins et al. (2019) em tomate, que observaram a ocorrência de decréscimo gradual no conteúdo de amido de acordo com a redução dos níveis de GAs. Tendo em

vista que neste estudo o aumento nos níveis de GAs com a aplicação de GA<sub>3</sub> também reduziu o conteúdo de amido.

Mudanças consideráveis foram observadas no metabolismo primário da parte aérea, principalmente no tratamento com baixos níveis de GAs via aplicação de PAC. Um dos efeitos foi o aumento no teor de sacarose, com concomitante redução no teor de frutose e glicose. O efeito dos açúcares no crescimento das plantas em desenvolvimento é diversificado, no qual a sacarose é a principal via de regulação do crescimento (Lastdrager et al. 2014). A redução dos níveis de GAs com a aplicação de PAC resultou em menor produção de biomassa na parte aérea, provavelmente por menor utilização de sacarose durante seu crescimento, uma vez que sua exportação induz maior produção de biomassa. Os níveis de sacarose podem ter sido incrementados pela atividade da sacaroses-fosfato sintases (SPS) na conversão de UDP-glicose e frutose em sacarose, (Ruan 2012).

Os fitohormônios detêm mecanismos regulatórios no transporte de assimilados, sendo as GAs reconhecidamente responsáveis por influenciar a relação força-dreno, através do aumento na utilização de nitrogênio do solo (N) e aumento da fotossíntese (Iqbal et al. 2001). Incrementos na assimilação de CO<sub>2</sub> requer maior produção de energia em forma de açúcares e/ou amido, sendo a sacarose o tipo de açúcar mais transportado, mas sua utilização depende da clivagem de hexoses e de enzimas como a sacarose sintase (*SUS*) e invertases (Sturm 1999). O aumento dos níveis de GAs com aplicação de GA<sub>3</sub> regulou os níveis de açúcares diferentemente. Já o aumento da concentração de frutose e glicose nestas plantas poderia estar relacionado a atividade de *SUS* e invertases. A *SUS* poderia estar regulando a degradação de sacarose na presença de UDP em UDP-glicose e frutose para aumento da biossíntese de celulose (Ruan 2012). Apesar do conteúdo de celulose não ter sido incrementado neste tratamento, é possível que esta regulação tenha sido responsável por aumentar o conteúdo de lignina. Em algodão por exemplo, o aumento do número de fibras lignificadas foi correlacionado a maior atividade da *SUS* (Bai et al. 2014). As invertases também podem ter influenciado o aumento nas concentrações de frutose e glicose, uma vez que seu papel regulatório também está correlacionado a partição de carbono e força do dreno (Ruan 2012).

## 6 Conclusão

Tendo em vista os problemas enfrentados na agricultura, sendo a ocorrência de acamamento um deles, a regulação dos níveis de GAs nas plantas continua sendo uma ferramenta satisfatória. A utilização de PAC como regulador de crescimento na cultura da soja foi satisfatória para reduzir o porte da planta. As alterações morfológicas e fisiológicas induzidas pelo PAC foram favoráveis para controlar o acamamento como redução no comprimento do caule e acúmulo de celulose na composição da parede celular. A regulação de GAs proporcionou além da redução do porte, plantas com anatomia foliar, caulinar e da raiz diferenciadas, que resultou em melhorias na eficiência fotossintética, utilização e produção de metabólitos primários. A partir da aplicação de PAC neste estudo é possível sugerir a utilização do regulador de crescimento para obtenção de características fenotípicas de interesse, como a redução do comprimento do caule. Adicionalmente, um efeito positivo à aplicação seria o incremento das taxas fotossintéticas e regulação na utilização dos metabólitos primários. Por outro lado, a aplicação de GA<sub>3</sub> resultou no incremento de lignina, aumentando o número de tecidos lignificados como esclerênquima e tecidos condutores.

## 7 Referências

- BAI, W. et al. Gibberellin overproduction promotes sucrose synthase expression and secondary cell wall deposition in cotton fibers. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96537, 2014.
- BARROS, J. et al. The cell biology of lignification in higher plants. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1053-1074, 2015.
- BIEMELT, S. et al. Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 254-265, 2004.
- BINENBAUM, J. et al. Gibberellin Localization and Transport in Plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 5, p. 410-421, 2018.
- BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 337-363, 2010.

CALDANA, C. et al. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 73, n. 6, p. 897-909, 2013.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850, 2005.

CRUCIOL, G. C. D. et al. Aplicação de ácido giberélico e paclobutrazol na cultura da soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 1, n. 2, p. 72-79, 2014.

CRUZ, C.D. GENES—A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276. 2013.

ERIKSSON, M. E. et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 784, 2000.

FALCIONI, R. et al. Distinct growth light and gibberellin regimes alter leaf anatomy and reveal their influence on leaf optical properties. **Environmental and Experimental Botany**, v. 140, p. 86-95, 2017.

FALCIONI, R. et al. Increased gibberellin levels enhance light capture efficiency in tobacco plants and promote dry matter accumulation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 30, n. 3, p. 235-250, 2018.

FERNIE, A. R. et al. Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, n. 2, p. 250-263, 2001.

FLEXAS, J. et al. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 5, p. 602-621, 2008.

FOSTER, C. E. et al. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part II: carbohydrates. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 37, 2010 (a).

FOSTER, C. E. et al. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part I: lignin. **Journal of Visualized Experiments**, n. 37, 2010 (b).

GARDINER, B. et al. Wind impacts on plant growth, mechanics and damage. **Plant Science**, v. 245, p. 94-118, 2016.

GIBON, Y. et al. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities

and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3304-3325, 2004.

GUO, H. et al. Exogenous GA<sub>3</sub> application enhances xylem development and induces the expression of secondary wall biosynthesis related genes in *Betula platyphylla*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22960-22975, 2015.

HARBERD, N. P. et al. The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. **The Plant Cell**, v. 21, n. 5, p. 1328-1339, 2009.

HEDDEN, P. The genes of the Green Revolution. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2003.

HEDDEN, P.; THOMAS, S. G. Gibberellin Biosynthesis and its Regulation. **Biochemical Journal**, v. 444, n. 1, p. 11-25, 2012.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A century of Gibberellin Research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 740-760, 2015.

HUANG, et al. A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. **The Plant Cell**, v. 27, n. 6, p. 1681-1696, 2015.

HUGHES, J.; MCCULLY, M. E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v. 50, n. 5, p. 319-329, 1975.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **McGraw-Hill Book Company**, Inc.; London, 1940.

KAMRAN, M. et al. Effect of paclobutrazol, a potential growth regulator on stalk mechanical strength, lignin accumulation and its relation with lodging resistance of maize. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 317-332, 2018 (a).

KAMRAN, M. et al. Application of paclobutrazol: a strategy for inducing lodging resistance of wheat through mediation of plant height, stem physical strength, and lignin biosynthesis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 29, p. 29366-29378, 2018 (b).

KASHIWAGI, T. et al. Improvement of lodging resistance with QTLs for stem diameter in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 5, p. 749-757, 2008.

KUMAR, M. et al. Functional analysis of cellulose synthase (CESA) protein class specificity. **Plant physiology**, v. 173, n. 2, p. 970-983, 2017.

LASTDRAGER, J. et al. Sugar signals and the control of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 799-807, 2014.

LIMA, C. S. et al. Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 149, p. 59-69, 2018.

LIU, W. et al. Relationship between cellulose accumulation and lodging resistance in the stem of relay intercropped soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Field Crops Research**, v. 196, p. 261-267, 2016.

LIU, C. et al. Shortened basal internodes encodes a gibberellin 2-oxidase and contributes to lodging resistance in rice. **Molecular Plant**, v. 11, n. 2, p. 288-299, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOQUE, D. et al. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 151-161, 2015.

MANSOUR, M. M. Response of soybean plants to exogenously applied with Ascorbic acid, Zinc Sulphate and Paclobutrazol. **Report and Opinion**, v. 6, n. 11, p. 17-25, 2014.

MARTINS, A. O. et al. Differential root and shoot responses in the metabolism of tomato plants exhibiting reduced levels of gibberellin. **Environmental and Experimental Botany**, v. 157, p. 331-343, 2019.

NETO, M. L. N. et al. Dissipation of excess photosynthetic energy contributes to salinity tolerance: A comparative study of salt-tolerant *Ricinus communis* and salt-sensitive *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 1, p. 23-30, 2014.

O'BRIEN, T. P. et al. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

PENG, J. et al. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes & Development**, v. 11, n. 23, p. 3194-3205, 1997.

PENG, D. et al. Lodging resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.): Lignin accumulation and its related enzymes activities due to the application of paclobutrazol or gibberellin acid. **Field Crops Research**, v. 157, p. 1-7, 2014.

PLAZA-WÜTHRICH, S. et al. Gibberellin deficiency confers both lodging and drought tolerance in small cereals. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 643, 2016.

RAGNI, L.; GREB, T. Secondary growth as a determinant of plant shape and form. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2018. p. 58-67.

RIBEIRO, D. M. et al. Action of gibberellins on growth and metabolism of arabidopsis plants associated with high concentration of carbon dioxide. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1781-1794, 2012.

RIZZA, A.; JONES, A. M. The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 9-15, 2019.

RUAN, Y. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 33-67, 2014.

SANKHLA, N. et al. Growth and metabolism of soybean as affected by paclobutrazol. **Plant and Cell Physiology**, v. 26, n. 5, p. 913-921, 1985.

SCHNEIDER, R. et al. Two complementary mechanisms underpin cell wall patterning during xylem vessel development. **The Plant Cell**, p. tpc. 00309.2017, 2017.

SCHREIBER, U. et al. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, Ernst-Detlef; Caldwell, M. M. **Ecophysiology of Photosynthesis**. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. p. 49-70

SHAH, D. U. Developing plant fibre composites for structural applications by optimising composite parameters: a critical review. **Journal of Materials Science**, v. 48, n. 18, p. 6083-6107, 2013.

SHAH, D. U. et al. The strength of plants: theory and experimental methods to measure the mechanical properties of stems. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 16, p. 4497-4516, 2017.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 9, p. 1126-1149, 2007.

STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 282-292, 2012.

STOWE, B. B.; YAMAKI, T. The history and physiological action of the gibberellins. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 8, n. 1, p. 181-216, 1957.

SULPICE, R. et al. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10348-10353, 2009.

SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 537-542, 2000.

TURNER, S. R.; SOMERVILLE, C. R. Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. **The Plant Cell**, v. 9, n. 5, p. 689-701, 1997.

UBEDA-TOMÁS, S. et al. Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 625, 2008.

UBEDA-TOMÁS, S. et al. Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 326-331, 2012.

VANHOLME, R. et al. Lignin engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 278-285, 2008.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 301-307, 2008.

WANG, G. et al. Exogenous gibberellin enhances secondary xylem development and lignification in carrot taproot. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 839-848, 2017.

WANG, Y.; LI, J. Molecular basis of plant architecture. **Annual. Review Plant Biology**, v. 59, p. 253-279, 2008

XIAO, C. et al. Activation tagging of Arabidopsis POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION 2 promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. **The Plant Journal**, v. 89, n. 6, p. 1159-1173, 2017.

ZHANG, H. et al. Transcriptome characterization of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) seedlings in response to exogenous gibberellin applications. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 125, 2018.

ZHONG, R.; YE, Z. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 2, p. 195-214, 2014.

ZSÖGÖN, A. **Identification and characterization of a tomato introgression line with reduced wilting under drought**. 199 f. 2011. These (Doctor of Philosophy) Canberra: Australian National University, 2011.

## CAPÍTULO 2

### **Níveis de giberelinas alteram o crescimento, o metabolismo primário e a composição de lignina e celulose em plantas de soja cultivadas *in vitro***

#### **RESUMO**

O cultivo de plantas *in vitro* é uma ferramenta útil na produção e propagação de plantas para fins comerciais, estudos de engenharia e melhoramento genético. Na propagação *in vitro* de plantas, normalmente são disponibilizados macro e micronutrientes, vitaminas, fonte de carbono, luz e adicionalmente, pode-se utilizar reguladores de crescimento. As giberelinas (GAs) são fito-hormônios considerados reguladores de crescimento em plantas, normalmente utilizados para induzir, durante o cultivo *in vitro*, a floração, desenvolvimento do caule, assim como regulação do crescimento radicular. Para estudar como os níveis de GAs podem influenciar o crescimento das plantas, normalmente são utilizados reguladores de crescimento que inibem ou induzem o aumento da biossíntese de GAs como o paclobutrazol (PAC) e o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), respectivamente. O presente trabalho teve como objetivo verificar como a regulação dos níveis de GAs por PAC e GA<sub>3</sub> alterariam o crescimento, o metabolismo primário e a composição de lignina e celulose em plantas de soja cultivadas *in vitro*. Os resultados revelaram assim como observado em cultivo *ex vitro* a aplicação de PAC promoveu a redução do comprimento caulinar e menor alocação de biomassa no órgão. Já a suplementação com GA<sub>3</sub> *in vitro* resultou em respostas morfofisiológicas distintas do cultivo *ex vitro* como redução acentuada da biomassa radicular e foliar, assim como menor taxa de expansão foliar. Outra resposta observada com a regulação dos níveis de GAs foram modificações no consumo de frutose e sacarose, além dos incrementos em Chl total, proteínas e aminoácidos com a aplicação de PAC. A modulação dos níveis de GAs também modificou a anatomia da folha, caule e raiz, assim como a composição da parede celular da soja, sendo a aplicação de PAC relacionada ao aumento do conteúdo de celulose e GA<sub>3</sub> ao aumento do conteúdo de lignina.

**Palavras-chave:** *parede celular; Glicine max; acamamento*

## **1 Introdução**

A soja é uma cultura estudada, principalmente em programas de melhoramento genético para a geração de novas variedades mais produtivas e com maior tolerância à doenças e melhor adaptadas às diferentes regiões e condições de crescimento. No entanto, as metodologias empregadas, geralmente demandam longos períodos de cultivo e disponibilidade de campos experimentais ou ambientes controlados para o desenvolvimento de estudos que visam selecionar características fenotípicas de interesse agrônomo (Silva et al. 2017). Uma alternativa é o uso do cultivo *in vitro* que tem demonstrado ser uma ferramenta eficiente na propagação rápida de plantas com qualidade em grande escala, no controle das condições de crescimento do material manipulado obtendo plantas padronizadas oferecendo um maior controle de respostas fisiológicas.

A propagação de plantas *in vitro* se tornou uma ferramenta útil na produção de plantas com alto rigor sanitário e isentas de vírus, tendo uma importância prática na multiplicação de células, tecidos e órgãos de espécies de difícil propagação, como espécies nativas do cerrado de interesse florestal e econômico, ou com baixo potencial germinativo (Espinosa-Leal et al. 2018). Além disso, a utilização desta técnica possibilita maior facilidade na manipulação do genoma de plantas através de transformação genética, assim como aumento rápido no número de plantas geneticamente idênticas e uniformes (Altpeter et al. 2016). A técnica de propagação de plantas *in vitro* possibilita uma grande flexibilidade nas condições de cultivo tais como meios de cultura contendo as concentrações ideais de sais (Espinosa-Leal et al. 2018) podendo ser adicionado ao meio de cultura vitaminas e reguladores do crescimento, além de outros compostos.

As giberelinas (GAs) fazem parte de um grupo composto por ácidos carboxílicos diterpênicos tetracíclicos com aproximadamente 136 estruturas moleculares identificadas até o momento, sendo algumas delas presentes em plantas superiores atuando como reguladores de crescimento (Hedden & Thomas 2012). As formas biologicamente ativas presentes em plantas são GA<sub>1</sub> e GA<sub>4</sub> permitindo a associação entre o receptor GA-

GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID) com proteínas DELLA, induzindo o alongamento do caule através da inibição de fatores de crescimento (Binenbaum et al. 2018). O ácido giberélico GA<sub>3</sub> também é uma forma bioativa em plantas superiores, no entanto está presente em menor quantidade ou em tecidos específicos (Hedden & Thomas 2012). No cultivo *in vitro* GAs podem ser utilizadas para promover a floração, o alongamento do caule e da parte aérea, assim como diminuir ou prevenir a formação de raízes, parte aérea ou embriogênese somática (Gaspar et al. 1996).

O controle da biossíntese de GAs pode ser feito através de ferramentas genéticas como regulação da expressão de genes envolvidos em diferentes estádios de desenvolvimento da planta de interesse, ou através da inibição dos precursores e das formas ativas nas plantas (Rizza & Jones 2018). Existem muitos compostos que regulam o crescimento inibindo a biossíntese de GAs, como os da classe de triazóis (Gaspar et al. 1996), tal como o paclobutrazol que atua na inibição das enzimas catalizadoras das etapas oxidativas da biossíntese de GAs, possibilitando o controle do porte da planta a partir da regulação de sua concentração (Schröder et al. 2014).

Uma vez que as GAs interferem no crescimento das plantas alterando o padrão de desenvolvimento das folhas, caule e raiz (Hedden & Sponsel 2015), estudar as regulações ocasionadas com a redução ou aumento dos níveis deste hormônio se torna necessário. O crescimento também é modulado por compostos que atuam na composição da parede celular como celulose e lignina. Na constituição da parede celular primária, as microfibrilas de celulose possuem padrão de deposição transversal ao eixo de alongamento, direcionando o crescimento celular e a morfologia da planta (Gu & Somerville 2010). Na formação da parede celular secundária a lignina é um produto da rota de fenilpropanóides requerido por polímeros hidrofóbicos como cutina, suberina, e metabólitos especializados, que realiza ligações covalentes com hemiceluloses proporcionando maior rigidez a parede (Bonawitz & Chapple 2010). O estudo da regulação do crescimento da regulação do crescimento por GAs, biossíntese de celulose e lignina tem sido alvo de discussão em muitas espécies (Eriksson et al. 2000; Huang et al. 2015; Liu et al. 2018; Kamram et al. 2018a, 2018b), mas poucos abordam como a regulação do hormônio poderia afetar o metabolismo da planta (Ribeiro et al. 2012a).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a propagação *in vitro* de uma cultivar de soja para investigar como o uso dos reguladores de crescimento GA<sub>3</sub> e PAC modulam as respostas anatômicas, fisiológicas e moleculares. Além disso, entender como a aplicação de PAC controla a biossíntese de GAs modulando a arquitetura da parte aérea, o teor de lignina e celulose e a expressão de genes relacionados a biossíntese da parede celular durante a propagação *in vitro* da linhagem de soja UFVS 86B10 que apresenta hábito de crescimento indeterminado.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de soja (*Glycine max* L.), cultivar UFVS 86B10 foram adquiridas a partir do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro/UFV. Para o cultivo *in vitro*, as sementes foram esterilizadas por meio de imersão em ETOH 70% por 30 segundos, e em seguida em solução de NaClO 2,5%, TWEEN® 20% (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO, USA) por 15 minutos. Posteriormente, as sementes esterilizadas foram lavadas cinco vezes em água estéril. Em seguida, foram distribuídas em placas estéreis contendo meio MS sólido (Murashige & Skoog 1962) ½ força com a metade dos sais e vitaminas, suplementado com 3% de sacarose (p/v), 0.005% de mio-inositol (p/v), 0,25% de Fitagel® (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO, USA), pH 5,7±0,01. As placas foram transferidas para uma sala climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C, irradiância 56 μmol cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de escuro.

Após atingirem um padrão de 5 cm de radícula, aproximadamente 5 dias após germinação as plântulas foram transplantadas para frascos de vidro (600 mL) vedados com tampas de propileno rígido (TPR) com duas membranas hidrofóbicas permeáveis (PTFE, MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) contendo meio MS força total com sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962). O meio MS foi ajustado com 3% de sacarose (p/v), 0.01% de Mio-inositol e 0.25% de Fitagel® pH, 5,8. Os meios de cultivo consistiram em: controle (meio MS força total com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento); GA<sub>3</sub> (5,8 μM); PAC (5,1 μM) e PAC (5,1 μM) + GA<sub>3</sub> (5,8 μM). A solução de GA<sub>3</sub> estéril foi adicionada ao meio MS (60° C) em câmara de fluxo contínuo, enquanto

a solução de PAC foi adicionada durante o preparo do meio antes de tratamento térmico para esterilização.

## *2.2 Análise de crescimento*

Plantas de soja foram utilizadas para avaliação do comprimento caulinar e radicular (cm), diâmetro do caule (mm), área foliar total e específica, e para a quantificação da biomassa total e por órgãos específicos da planta. Adicionalmente à quantificação de biomassa, frações de massa foliar, caulinar e radicular foram utilizadas para determinação da fração de biomassa acumulada de acordo com o carbono drenado pelo órgão (Ribeiro et al. 2012a). A razão entre a massa seca da parte aérea (folha, caule) e da raiz também foi avaliada. A área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE) foram avaliadas após a retirada das folhas de cada unidade experimental as quais foram fotografadas e mensuradas pelo programa Image J<sup>®</sup>. A avaliação da AFE (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) foi realizada conforme Zsögön (2011) através da relação entre a área foliar total (cm) e a massa seca da folha (g).

## *2.3 Metabólitos primários e proteínas solúveis*

Na quantificação dos metabólitos primários foram utilizadas amostras compostas pelo caule e pelo terceiro trifólio completamente expandido. Estas foram coletadas, pulverizadas em nitrogênio líquido, maceradas e posteriormente liofilizadas. À porção de 15 mg de massa liofilizada foi adicionado 250 µL de ETOH 98%, em seguida a solução foi incubada por 20 m a 80°C, sob agitação contínua a 950 rpm. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 10 m, sendo o sobrenadante transferido para novos tubos. Posteriormente, o processo de extração foi repetido com as concentrações de ETOH 80 e 50%. Na fração etanólica solúvel foram determinados os teores de clorofilas totais (Chl total), glicose, frutose, sacarose e aminoácidos totais; enquanto na fração insolúvel foram determinados os teores de proteínas totais e amido (Ferne et al. 2001).

## *2.4 Proteínas totais*

A determinação de proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Gibon et al. (2004). Na fração insolúvel foi adicionado 1000  $\mu\text{L}$  de ETOH 100%, seguida de centrifugação a 14000 rpm a 4°C por 10 m. Após o descarte do sobrenadante e nova centrifugação a 14000 rpm a 4°C por 5 m, foi adicionado às amostras uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 M sendo incubadas por 1h a 95°C sob agitação contínua a 450 rpm. A concentração total de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), e sendo os resultados expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  MS.

### *2.5 Aminoácidos totais*

Para obter a concentração de aminoácidos totais livres foi retirada uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da fração etanólica solúvel obtida durante o processo de extração das amostras. Esta alíquota foi utilizada para montagem do meio de reação constituído de 45  $\mu\text{L}$  de ETOH 70%, 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato (Na-Citrato 1M + 0,2% de ácido ascórbico, pH 5,2), e 100  $\mu\text{L}$  de niidrina 1% (em ETOH 70%). A reação foi incubada por 20 min a 95°C protegida de iluminação. A concentração de aminoácidos totais livres foi calculada a partir de uma curva padrão de leucina, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS.

### *2.6 Concentração de amido*

A análise de quantificação de amido foi obtida a partir da fração insolúvel da extração etanólica, após adição de NaOH 0,1 M (Fernie et al. 2001). A cada amostra, foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial 1 M. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 m. Para a degradação do amido foram utilizados 60  $\mu\text{L}$  do mix de digestão contendo as enzimas amiloglicosidade e  $\alpha$ -amilase, tampão acetato de sódio (0,5 M pH 4,9) e 40  $\mu\text{L}$  da amostra neutralizada com ácido acético glacial. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 1h a 55 °C, sob agitação constante a 500 rpm. A leitura foi realizada com 10  $\mu\text{L}$  da amostra, 160,7  $\mu\text{L}$  do mix de quantificação contendo tampão HEPES/ KOH (1 M pH 7,0 +  $\text{MgCl}_2$  30 mM), ATP (109 mM,  $\text{NADP}^+$  48,3 mM, e G6DPH II), e 3  $\mu\text{L}$  de hexocinase em uma cinética de 120

minutos a 340 nm. A concentração de amido foi obtida pelo valor da quantidade de glicose degradada expressa em  $\mu\text{mol}$  de amido  $\text{g}^{-1}$  MS.

### *2.7 Concentração de clorofilas totais*

Na determinação de clorofilas foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de ETOH 98% e 15  $\mu\text{L}$  do Mix de ETOH (ETOH 95, 80, 50 % 1:1:1) a 35  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico solúvel. A leitura foi realizada a 645 e 665 nm, sendo o cálculo de Chl  $a= 5,21* \text{abs } 665\text{nm} - 2,07* \text{abs } 645 \text{ nm}$  e Chl  $b= 9,29* \text{abs } 645 \text{ nm} - 2,74* \text{abs } 665 \text{ nm}$  (Gibon et al. 2004; Sulpice et al. 2009).

### *2.8 Concentração de açúcares*

Para a determinação de glicose, frutose e sacarose foi utilizada a metodologia proposta por Fernie et al. (2001). Alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico solúvel foram adicionadas a 160  $\mu\text{L}$  do mix de quantificação (tampão HEPES /KOH 1 M +  $\text{MgCl}_2$  30 mM, ATP 109 mM,  $\text{NADP}^+$  48,3 mM, e G6DPH II), e 10  $\mu\text{L}$  de ETOH 80%. A leitura foi realizada a 340 nm até estabilização da linha de base de acordo com a adição das enzimas hexocinase, fosfoglicose isomerase e invertase. O cálculo foi obtido através da equação  $\Delta\text{OD} / (2,85*6,22)$ , e os resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS.

### *2.9 Análises de anatômicas e histoquímicas*

Avaliações relativas a organização estrutural, celular, espessura e número de células foram realizadas em cortes anatômicos obtidos da região mediana do caule, do segmento da raiz principal (2 cm) e da porção mediana do folíolo central da folha mais jovem completamente expandida. Em seguida, as amostras foram fixadas em formaldeído:ácido acético 50% (FAA<sub>50</sub>) por 48 h e estocadas em etanol 70 % (Johansen, 1940). Os materiais vegetais foram posteriormente incluídos em metacrilato (Leica Historesin<sup>®</sup> Plus), de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes transversais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura da folha, caule e raiz foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA), e depositados em lâminas de vidro. Os materiais seccionados foram corados com solução

de azul de toluidina a 0,05% em pH 4,0 (O'Brien et al. 1964), sendo em seguida lavados em água corrente.

As imagens para análise quantitativa dos cortes anatômicos foram obtidas por câmera fotográfica digital (modelo Moticam 580 5.0 MP, Motic, Hong Kong) acoplada ao microscópio óptico (modelo LOTUS MCX51, Micros, Austria). Após obtenção das imagens foram avaliados os parâmetros quantitativos com o programa Image-Pro Plus®: de área (espaço intercelular) e de espessura: na folha (faces abaxial e adaxial, mesofilo, parênquima paliçádico e esponjoso); no caule (xilema, parênquima fundamental, colênquima, câmbio vascular, esclerênquima); e na raiz (epiderme, córtex, diâmetro do cilindro vascular). Adicionalmente, foi realizado a contagem do número de células a partir da padronização de uma área conhecida de 100  $\mu\text{m}^2$  relativo ao número de células do parênquima, colênquima e esclerênquima no caule.

Cortes transversais dos órgãos vegetais foram realizados a fresco e à mão livre, corados de acordo com os compostos de interesse que se pretendia identificar. Para análise histoquímica de compostos de celulose, como  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 glucanos, polissacarídeos carboxilados e calose foi utilizada a solução de Calcofluor White Stain 0,01% (Sigma-Aldrich®) de acordo com metodologia proposta por Hughes & McCully (1975). Cortes à mão livre foram realizados no caule e raízes, e posteriormente corados por 20 s com a solução de Calcofluor. As imagens para análise estrutural qualitativa foram obtidas com objetiva de 4x através da câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) acoplada ao microscópio óptico (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Na análise histoquímica para detecção de ligninas, foi utilizado o método de coloração de com floroglucina ácida (Johansen 1940). Seções transversais da folha, caule e raiz foram cortados a fresco. Os tecidos cortados foram colocados em contato por 5 min em duas soluções: uma de floroglucina 2% em ácido clorídrico 25% e a outra de ácido clorídrico 25%. As imagens para análise estrutural qualitativa da composição de lignina foram obtida com objetivas de 5, 10 e 20x através de câmera digital fotográfica (modelo

Zeiss AxioCam 105 color - Z, Göttinger, Germany) acoplada ao microscópio óptico (modelo Zeiss – Scope A1, Olympus Optical, Tokyo, Japan) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

### *2.10 Isolamento de parede celular*

O isolamento de parede celular foi realizado de acordo com Acker et al. (2013) em amostras de 15 mg compostas por caule e folha liofilizadas. Foram adicionados às amostras 1000 µl dos solventes em cada etapa de extração MQ-H<sub>2</sub>O 98° C, de ETOH 100 % 76° C, clorofórmio 59° C, e acetona 100% 54° C, respectivamente. O resíduo da parede celular obtido ao final dos processos de extrações foi seco em evaporado rotativo à vácuo por 8h. Em seguida o material foi submetido ao processo de hidrólise do amido (Ferne et al. 2001), e posterior lavagem do pellet formado com ETOH (70%). Após uma última secagem em evaporado rotativo à vácuo por 4h foi obtido a parede celular isolada.

No material foi realizado uma nova extração para remoção de hemicelulose, adicionando 1000 µL de ácido trifluoroacético 2M à parede celular que foi incubada por 2h a 99° C a 750 rpm. O sobrenadante foi retirado e ao pellet formado foram realizadas três lavagens sucessivas adicionando 1000 µL MQ-H<sub>2</sub>O com centrifugações a 10000 rpm, a 4° C por 10 min, entre elas. O pellet purificado foi lavado com 1000 µL de acetona e centrifugado a 14000 rpm a 4° C por 3 min. A parede celular isolada para quantificação de celulose e lignina foi obtida após secagem do material extraído em evaporador rotativo à vácuo.

### *2.11 Quantificação de celulose e lignina*

A quantificação de celulose foi realizada de acordo com Acker et al. (2013). Em média 5 mg de parede celular isolada das amostras foram incubadas com 1000 µL de ácido sulfúrico 100% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 1h a 90°C, sob agitação constante a 500 rpm. Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 14000 rpm por 5 min a 4°C. Com a formação de fases, foram retiradas alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes e adicionados 150 µL de ácido sulfúrico 100%, e 30 µL de fenol 5% para realizar a reação. As amostras foram incubadas por 5 min a 90°C, sob agitação constante a 500 rpm, sendo

sequencialmente resfriadas em banho de gelo. A leitura foi realizada a 493 nm em alíquotas de 100 µL retiradas dos meios de reação. A quantificação de celulose foi feita com base na massa da parede celular utilizada e a equação gerada a partir de um padrão de celulose (Sigma-Aldrich®).

A quantificação de lignina foi conduzida através da versão modificada do método do brometo de acetila (Foster et al. 2010; Acker et al. 2013). Após a purificação da parede celular, aproximadamente 6 mg do material foi dissolvido em 100 µL de brometo de acetila 25% (diluído em ácido acético glacial). Em seguida 4 µL de ácido perclórico 60% foi adicionado à solução e incubado por 30 min a 70° C, sob agitação constante a 850 rpm. O material foi posteriormente centrifugado a 14000 rpm por 15 min a 4°C, sendo ao final da centrifugação adicionado 1000 µL de ácido acético glacial. Como produto da diferenciação das fases, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, enquanto os pellets foram lavados com NaOH e ácido acético com nova centrifugação de 14000 rpm a 4°C por 15 min.

O volume final foi ajustado para 2 mL com ácido acético, e o material foi mantido em temperatura ambiente por 20 min até a leitura. O teor de lignina foi determinado em 200 µL/ poço pela leitura da absorbância a 280 nm em leitor de placas UV. O coeficiente utilizado para determinar a porcentagem de lignina solúvel em brometo de acetila na soja foi com base no coeficiente de determinação de *Arabidopsis* (15,69 g<sup>-1</sup>) (Vogel 2008; Foster et al. 2010). O cálculo de lignina foi feito de acordo com a concentração de lignina solúvel em brometo de acetila, em que:  $Lignina = [Abs / (coeficiente \times comprimento \ de \ percurso \ da \ placa)] \times [(2 \ ml \times 100\%) / peso \ (mg)]$ , onde; a concentração de lignina é dada em µg mg<sup>-1</sup> de parede celular.

### 2.12 Análise de expressão

Amostras compostas do caule e do trifólio foram coletadas, maceradas e homogeneizadas em TRIzol® (ThermoFisher scientific) para isolar o RNA de acordo com recomendações do fabricante. Posteriormente, em média 10 µg RNA isolado foi adicionado DNase I (Invitrogen®) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade

e qualidade da amostra de RNA foram determinadas utilizando Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA com Super Script™ III, First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). A corrida de RT-qPCR foi realizada no equipamento CFX96 Touch™ (BIO-RAD), utilizando SYBR Green I (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA). O perfil de expressão gênica foi normalizado através do gene *Gmβ-actina* (F5' -TGGACTCTGGTGTGGTGTG-3' e R5'-CTCAGCAGAGGTGGTGAACA-3') como controle (Li et al. 2015), sendo calculado os níveis relativos de expressão de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de acordo com metodologia de Livak & Schmittgen (2001). Os primers de genes específicos para biossíntese de celulose e lignina na parede celular da soja desenhados foram: foram *Gm4CL* (F5-CAGCTTCAGAGGGGTAGTGC-3' e R5'-CAGCGCCAGAACCAATATGC-3'), *GmCCoAOMT* (F5'-GGCTGGTGTAGAGCACAAGA-3' e R5'TATCGGCATCAACGAAGGCA-3'), *GmCESA8* (F5'-TCAAAGGTCTCATGGGTCGC-3' e R5'-TATGGCAATGCAGGTCTCGG-3'), e *GmCESA7* (F5'-TGGTCGCTGGGTACATAAC-3' e R5'-CCCACTCATTGCAAGCCAC-3'). As médias foram comparadas pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ).

Gene	Nome	Reação catalisada	Função
<i>Gm PAL</i>	Glycine max phenylalanine ammonia-lyase	L-phenylalanine = trans-cinnamate + ammonia	Catalisa a desaminação não-oxidativa da L-fenilalanina para formar ácido trans-cinâmico, o primeiro passo na via dos fenilpropanóides
<i>Gm 4CL</i>	Glycine max 4-coumarate-CoA ligase-like 7-like	ATP + 4-coumarate + CoA AMP + diphosphate + 4-coumaroyl-CoA	CoA ligase que representa a enzima de ponto de ramificação do metabolismo da rota de fenilpropanóides na planta, catalisando a ativação do ácido 4-coumárico e vários outros derivados do ácido cinâmico hidroxilado e metoxilado aos ésteres de CoA correspondentes em uma reação em duas etapas.

<b>Gm CCoAO MT</b>	Glycine max probable caffeoyl-CoA O-methyltransferase At4g26220-like	S-adenosyl-L-methionine + caffeoyl-CoA = S-adenosyl-L-homocysteine + feruloyl-CoA	
<b>Gm CCoAR</b>	Glycine max cinnamoyl-CoA reductase 2-like	Cinnamaldehyde + CoA + NADP+ = cinnamoyl-CoA + NADPH	Proteínas envolvidas na biossíntese da via fenilpropanóide, que faz parte do metabolismo do composto aromático.
<b>Gm CesA4</b>	Glycine max cellulose synthase A catalytic subunit 4	UDP-glucose + (1,4-beta-D-glucosyl)(n) = UDP + (1,4-beta-D-glucosyl)(n+1)	Subunidade catalítica de complexos terminais de celulose sintase ("rosetas"), necessária para a cristalização de microfibrilas beta-1,4-glucanas, um dos principais mecanismos de formação da parede celular. Envolvido na formação da parede celular secundária. Necessário para o espessamento da parede celular do xilema
<b>Gm CesA8</b>	Glycine max cellulose synthase A catalytic subunit 8		

### 2.13 Microscopia confocal

A análise de imunolocalização foi realizada de acordo com metodologia descrita por Avcı et al. (2012). Cortes anatômicos da região mediana do caule e de seções foliares foram lavados em tampão fosfato 25 mM pH 7.1, e posteriormente fixados em solução de formaldeído/ glutaraldeído [1,6% (v/v) de paraformaldeído: 0,2% (v/v) glutaraldeído em tampão fosfato 25 mM 7.1)]. Durante o processo de fixação, os materiais foram infiltrados por 30 minutos com bomba de vácuo. Após esta etapa, uma nova lavagem com tampão fosfato 25 mM pH 7.1 foi realizada para a desidratação dos materiais através de série etílica com ETOH diluído em H<sub>2</sub>O deionizada nas proporções: 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), e 100% (v/v). O material foi incluído em resina acrílica LR White com catalisador de peróxido de benzoíla com diciclohexil ftalato (Sigma-Aldrich), polimerizada a 4° C sob leve agitação.

O processo de embebição foi realizado em cápsulas adaptadas, sendo a secagem conduzida em estufa de circulação à ar, 50° C por 5 dias. Cortes transversais de 5 µm da

folha e do caule foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA), depositados em lâminas de vidro de superfície inerte revestidas com poços. Alíquotas de solução não-específica de proteínas BSA 5% em tampão PBS 10 mM pH 7.2 foram adicionadas às lâminas para bloquear adsorção do anticorpo à sítios de ligação não-específicos na lâmina, que foram mantidas por 40 minutos em câmara úmida. Em seguida foi feito o processo de tríplice lavagem com solução tampão PBS 10 mM pH 7.2. Foi realizada a etapa de incubação com os Anticorpos primários monoclonais de parede celular para homogalacturonano (LM20), xilogalacturonano (LM8), glicoproteína arabinogalactana (JIM4) foram diluídos (1:10) em solução de BSA 1% em PBS 10 mM pH 7.2 foram adicionados aos cortes se ligando a um epítipo específico por 1:30 h em câmara úmida. Posteriormente foi realizada nova tríplice lavagem com solução tampão PBS 10 mM pH 7.2 para remoção dos anticorpos não ligados. Uma solução de anticorpo secundário imunoglobulina (IgG) anti-rato conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) diluído (1:100) em solução de BSA 1% em PBS (pH 7,2) foi adicionada aos cortes para que agisse contra o anticorpo primário em novo processo de incubação. O anticorpo secundário se liga ao anticorpo primário através de ligação enzimática que catalisa a reação com formação de um produto colorido. Em seguida foi feita mais uma etapa de tríplice lavagem com solução tampão PBS 10 mM pH 7.2 para remoção dos anticorpos secundários não ligados. A visualização em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss (modelo LSM510 META, Carl Zeiss Microscopy Ltd. Jena, Germany) foi feita no comprimento de onda de 488 $\nu\mu$ , comprimento de excitação 492 nm, e comprimento de onda de emissão de 518 nm com a adição de Citifluor<sup>®</sup> AF1 às lâminas.

#### *2.14 Análise estatística e design experimental*

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com uma cultivar UFVS 86B10, um período de aplicação e quatro tratamentos (controle, GA<sub>3</sub>, PAC. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Duncan

( $P < 0,05$ ) para comparação das médias dos tratamentos através do Software Genes (Cruz, 2013).

### **3 Resultados**

#### *3.1 GA e PAC alteraram o crescimento e a biomassa de raiz, caule e folhas de plantas de soja cultivadas in vitro*

Plantas de soja cultivadas *in vitro* por quinze dias apresentaram variações fenotípicas em todos os órgãos das plantas, sendo o tratamento com PAC responsável pela maior redução no comprimento da parte aérea (Figura 1).

A exposição aos tratamentos GA<sub>3</sub>, PAC e PAC + GA<sub>3</sub> promoveu redução no peso seco total das plantas (Figura 2A). Para a avaliação da massa seca das folhas houve redução apenas no tratamento com GA<sub>3</sub> (Figura 2C). Já para o caule, a maior redução ocorreu após tratamento com PAC, com 86% de redução em comparação aos tratamentos controle e GA<sub>3</sub> (Figura 2B). O tratamento PAC + GA<sub>3</sub>, que representa os efeitos de reversão da redução dos níveis de GAs na planta, também promoveu redução na biomassa do caule (Figura 2B). Diferentemente dos resultados observados na massa do caule e da folha, o peso seco da raiz foi maior no tratamento com PAC (Figura 2D). Já o tratamento com GA<sub>3</sub> reduziu em 44% o peso seco da raiz (Figura 2D).

A análise da fração de massa foliar e radicular foi resultou em maiores valores para os tratamentos com a presença de PAC (Figuras 3A e C). Por outro lado, a fração de massa caulinar reduziu nos tratamentos com PAC (Figura 3B). A razão entre a biomassa da parte aérea e da raiz foi maior nas plantas tratadas apenas com GA<sub>3</sub>, seguido pelo tratamento PAC+GA<sub>3</sub> e com menores valores no tratamento apenas com PAC (Figura 3D). As medidas de comprimento do caule mostraram que o PAC atua na redução desse parâmetro, visto que as maiores reduções ocorreram nos tratamentos com PAC e com PAC+GA<sub>3</sub>, respectivamente (Figura 3E). Por outro lado, não houve redução no diâmetro do caule (Figura 3F). A área foliar foi reduzida nos tratamentos com GA<sub>3</sub> e PAC (Figura 3G), no entanto não foram detectadas diferenças para área foliar específica (Figura 3H).

### *3.2 Regulação dos níveis de GAs induziu respostas distintas no metabolismo primário em soja cultivada in vitro*

Após tratamento com GA<sub>3</sub> e/ou PAC, houve aumento na concentração de proteínas totais (Figura 4A). Contudo, apenas na presença de PAC ocorreu aumento no teor de aminoácidos totais (Figura 4E). O teor de amido apresentou aumento apenas no tratamento com PAC e PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 4B). Para o metabolismo primário de açúcares, nota-se redução no teor de glicose, frutose e sacarose apenas no tratamento PAC+ GA<sub>3</sub> (Figura 4C, D e F). O conteúdo de Chl total foi maior no tratamento com PAC seguido pelo tratamento PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 4G).

### *3.3 Variação na concentração de GAs alterou a anatomia da soja cultivada in vitro*

Na anatomia foliar, diversas modificações qualitativas e quantitativas foram encontradas nas plantas tratadas com GA<sub>3</sub> e/ou PAC. Uma das alterações mais evidentes ocorreu no desenvolvimento do limbo foliar (Figura 5A-D). As plantas cultivadas na condição controle tiveram menor desenvolvimento anatômico e estrutural comparado aos demais tratamentos (Figura 5A-D). Esta modificação também foi nitidamente observada quando comparado os tratamentos GA<sub>3</sub> e PAC, sendo que este último induziu maior desenvolvimento anatômico (Figura 5B e C). Todavia, essa variação não ocasionou mudanças no espaço entre as células do controle, GA<sub>3</sub> e PAC, mas sim no tratamento com PAC + GA<sub>3</sub> que gerou maiores espaços intercelulares (Figura 5E). A espessura do mesófilo foi bastante desenvolvida no tratamento com PAC (Figura 5F), enquanto que o parênquima paliçádico teve maior espessura nos tratamentos com PAC e PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 5G), todavia a aplicação de GA<sub>3</sub> isoladamente resultou num desenvolvimento mais significativo da área do que o controle. O parênquima esponjoso se mostrou mais espesso em folhas de plantas tratadas com PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 5J). Os tratamentos não induziram diferenças significativas na espessura da epiderme foliar (Figura 5H), contudo na epiderme superior foi visto que o PAC + GA<sub>3</sub> induziu uma maior espessura, seguido de GA<sub>3</sub>, e PAC, enquanto o controle foi a região menos desenvolvida (Figura 5I).

O caule foi um o órgão mais alterado de acordo com as análises de crescimento, e também na avaliação estrutural de sua anatomia (Figura 6A e D). O xilema se tornou mais

espesso quando foi fornecido PAC no meio de cultura (Figura 6E). Não houve diferenças significativas para a espessura do parênquima fundamental (Figura 6F), o colênquima, por outro lado, foi intensamente alterado, sendo que nos tratamentos com PAC houve incrementos significativos (Figura 6G). Outra interferência anatômica no caule foi no câmbio vascular, onde a espessura foi significativamente aumentada com PAC e reduzida com GA<sub>3</sub> (Figura 6I). O esclerênquima também se desenvolveu mais no tratamento com PAC, enquanto que nos demais tratamentos não houveram modificações (Figura 6J). Na quantificação celular da estrutura do caule, foi observado que o número de células do parênquima cortical foi maior no controle do que quando aplicado GA<sub>3</sub> e/ou PAC (Figura 6H). Já a quantidade de células do colênquima foi significativamente reduzida com PAC (Figura 6K), diferentemente das células do esclerênquima, que não variaram entre os tratamentos (Figura 6L).

As variações na anatomia da raiz também foram estudadas (Figura 7A e D). A espessura da epiderme da raiz não variou significativamente entre os tratamentos (Figura 7E). O córtex, no entanto, foi uma região que sofreu modificações intensas, se tornando mais espesso com PAC comparado aos demais tratamentos (Figura 7F), o mesmo ocorreu com o cilindro vascular (Figura 7G).

#### *3.4 Teores de celulose e lignina na composição da parede celular em soja cultivada in vitro foram modificados pela regulação dos níveis de GAs*

Na quantificação de celulose nos tecidos constituintes do caule e folha, foram observados incrementos nos tratamentos com PAC e PAC + GA<sub>3</sub> (Figura 8I). Na análise histoquímica realizada por meio de fluorescência é possível detectar diferenças nítidas na intensidade do brilho presente no caule e na raiz entre os tratamentos (Figura 8A e H). No caule do tratamento controle e com GA<sub>3</sub> é possível observar que o parênquima medular foi menos desenvolvido, sendo a fluorescência mais evidente no córtex (Figura 8A e B). O tratamento PAC + GA<sub>3</sub> também induziu uma maior fluorescência no córtex caulinar, mas diferentemente do padrão observado no controle e no tratamento com GA<sub>3</sub>, o brilho foi intensificado também no parênquima medular (Figura 8D, A, B). Já no

tratamento com PAC foi observado uma maior fluorescência no caule como um todo (Figura 8C).

Na raiz, além de observar que a organização estrutural foi muito mais desenvolvida nos tratamentos controle e PAC (Figura 8E e G), o controle parece ter emitido uma maior intensidade de fluorescência em todo o órgão (Figura 8E). O tratamento com PAC induziu maiores intensidades de fluorescência no parênquima medular e no cilindro vascular (Figura 8G), apesar do tratamento com PAC + GA<sub>3</sub> ter induzido uma boa intensidade de fluorescência, não é possível destacar muito bem as estruturas devido problemas no corte a fresco e à mão livre (Figura 8H), sendo que o mesmo foi observado no tratamento com GA<sub>3</sub> (Figura 8F).

Os maiores conteúdos de lignina foram encontrados na parede celular de plantas crescidas na presença de GA<sub>3</sub> (Figura 9E), corroborando com este resultado, é possível observar que o tratamento que reduz os níveis de GAs na planta por meio do PAC foi o de menor concentração de lignina (Figura 9M). A aplicação do PAC em conjunto com GA<sub>3</sub> também induziu reduções na concentração de lignina em relação às plantas cultivadas com GA<sub>3</sub>, mas foram semelhantes ao controle (Figura 9M). Em relação à proporção celulose: lignina, foi observado que a contribuição na formação da parede celular no conteúdo de lignina é maior no controle e na presença de GA<sub>3</sub> (Figura 9N), enquanto o tratamento com PAC induziu uma maior razão celulose: lignina (Figura 9N).

Na histoquímica dos cortes da nervura mediana, caule e raiz foram visualizados a composição celular por lignina na formação das estruturas. A nervura mediana de folhas tratadas com GA<sub>3</sub> e controle parecem apresentar mais lignina na parede celular do xilema (Figura 9A e B), enquanto que no tratamento com PAC a participação de lignina da composição da parede celular do xilema parece ser bastante reduzida (Figura 9C). O caule de plantas tratadas com GA<sub>3</sub> e PAC + GA<sub>3</sub> nitidamente apresentaram um maior número de células do esclerênquima e do câmbio vascular lignificadas (Figura 9F e G), já em plantas cultivadas com PAC não foram observadas células do esclerênquima lignificadas, apenas células do xilema com parede secundária lignificadas (Figura 9G). Na raiz o GA<sub>3</sub> induziu um aumento no número de células lignificadas, evidente em todo o cilindro

vascular e endoderme (Figura 9J), enquanto que nos demais tratamentos paredes celulares lignificadas ficaram concentradas nos elementos traqueais do xilema (Figura 9I, J, K).

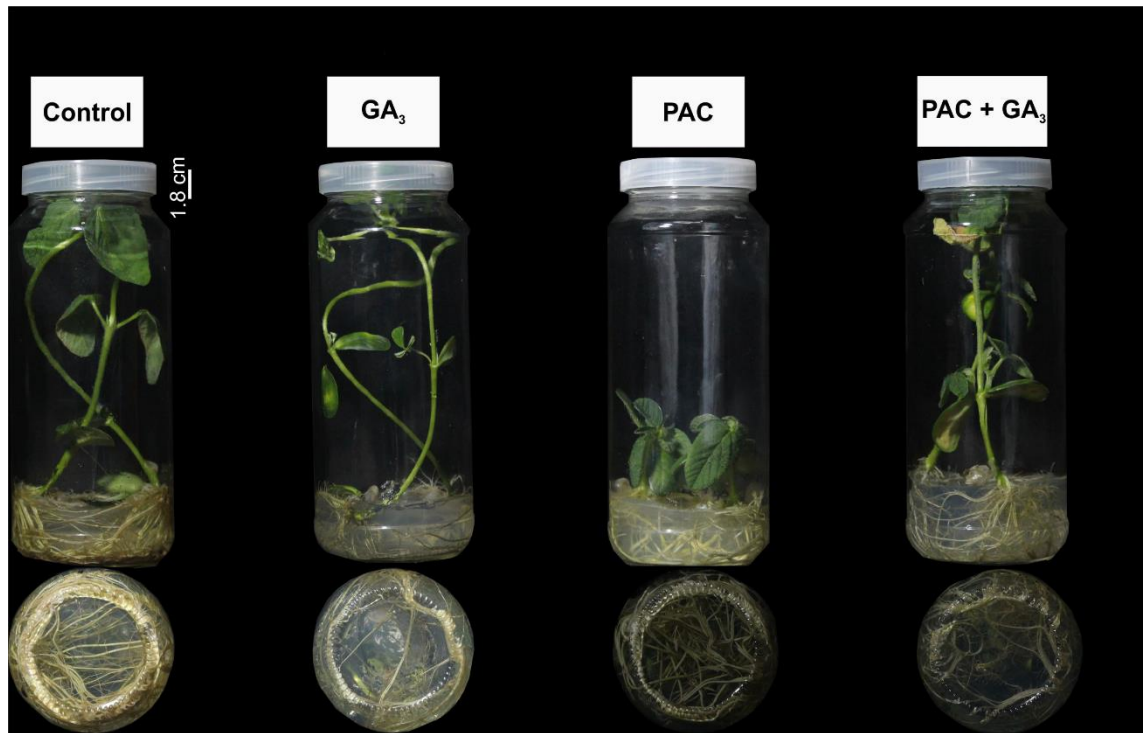
De acordo com os resultados da microscopia confocal, foi possível observar que os anticorpos marcados com o fluorocromo FITCH foram efetivos na excitação de fluorescência. Aparentemente as folhas do controle tiveram menor fluorescência em todos os anticorpos (Figura 10). Na utilização de anticorpos que se ligam principalmente à pectinas na parede celular (LM20 e LM8) e de glicoproteínas arabinogalactana (JIM4) foram observados maiores fluorescência na folha dos tratamentos com GA<sub>3</sub> e PAC, principalmente nos parênquimas paliçádico e esponjoso (Figura 10).

A imunofluorescência do caule mostrou que as maiores intensidades de fluorescência foram observadas no tratamento com GA<sub>3</sub> nos três anticorpos. Enquanto que no tratamento com PAC, as maiores intensidades foram observadas nos anticorpos que se ligam às pectinas. O tratamento de PAC + GA<sub>3</sub> também teve fluorescência detectada em todos os anticorpos, porém em menor intensidade.

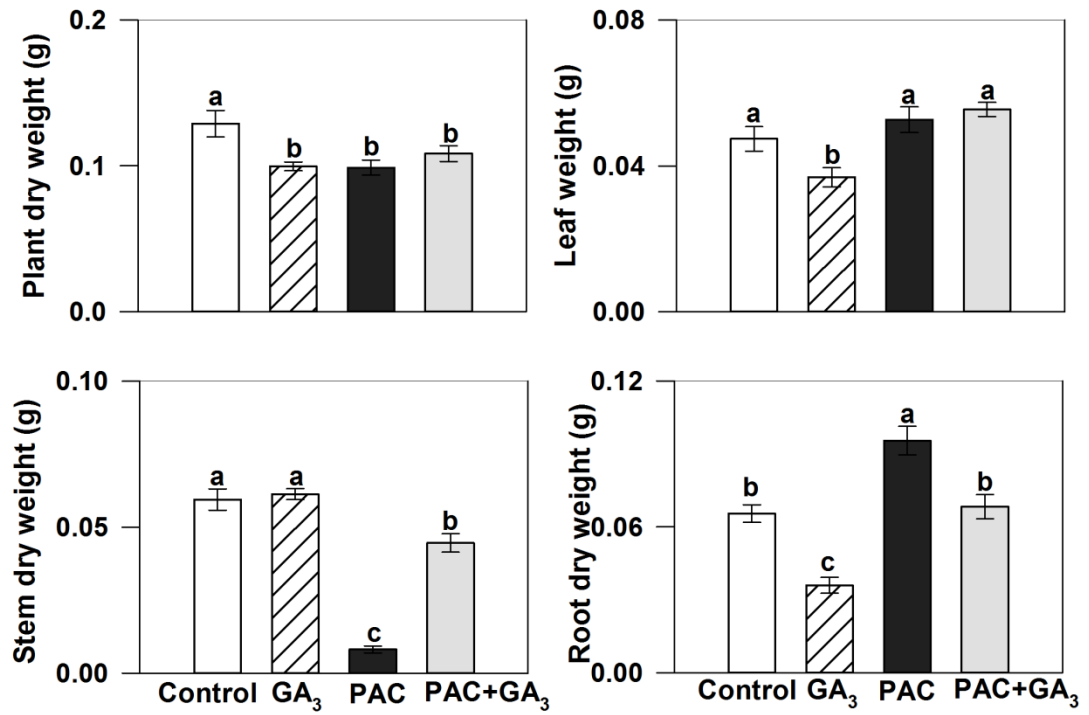
### *3.5 Sinalização desencadeada pelos níveis de GAs na regulação da expressão dos genes envolvidos na síntese de parede celular em soja*

Em relação à expressão dos genes de síntese de celulose, não houveram alterações significativas nos níveis de expressão de *GmCESA8* e *GmCESA4* (Figura 12). Na análise dos genes envolvidos na biossíntese de lignina, também não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes *Gm4CL*, *GmCCoAOMT*, *GmPAL* e *GmCCoAR* (Figura 13).

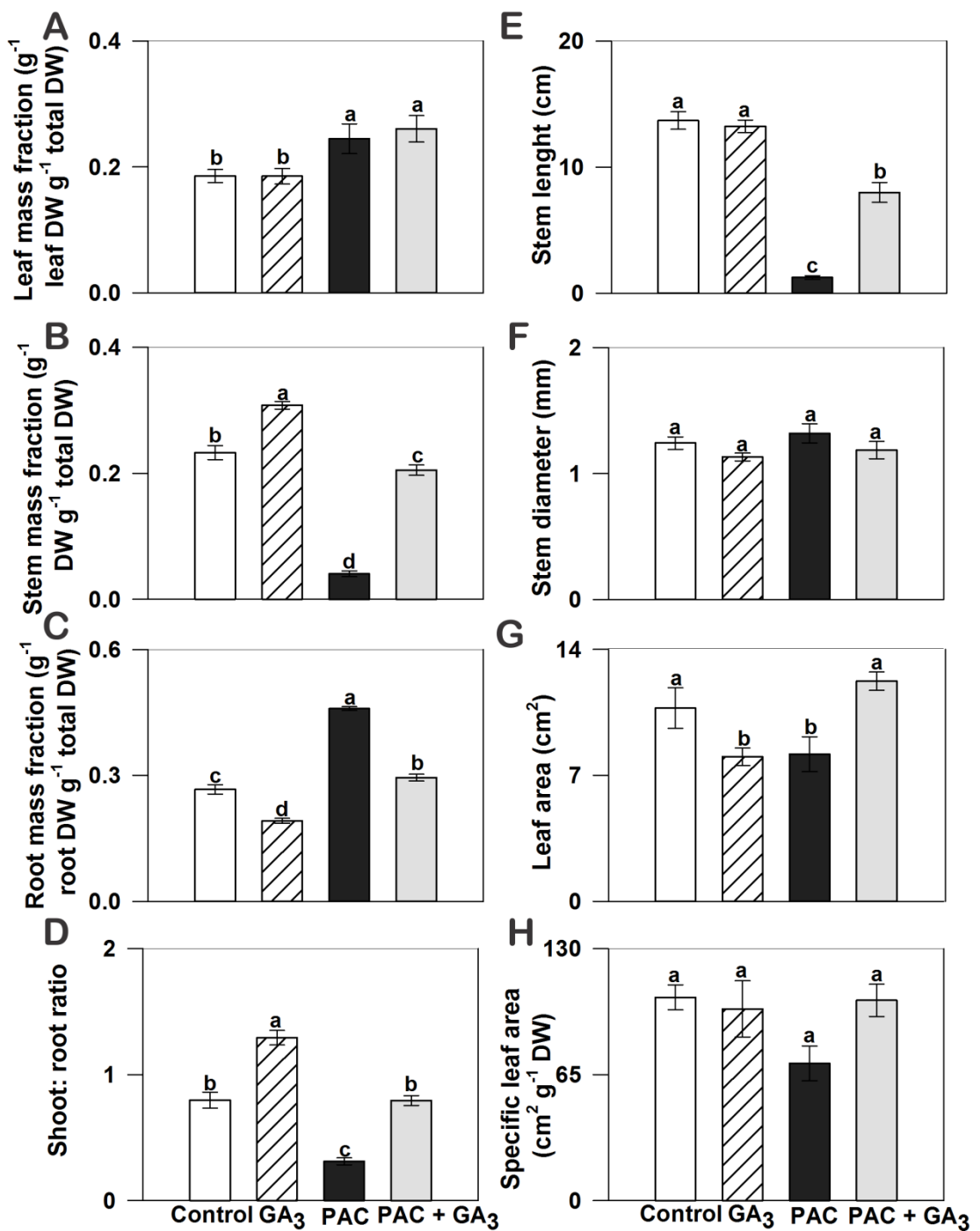
#### 4 Figuras capítulo 2



**Figura 1.** Variação no crescimento e desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular em soja cultivada *in vitro* após aplicação dos tratamentos: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 5.8  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>).

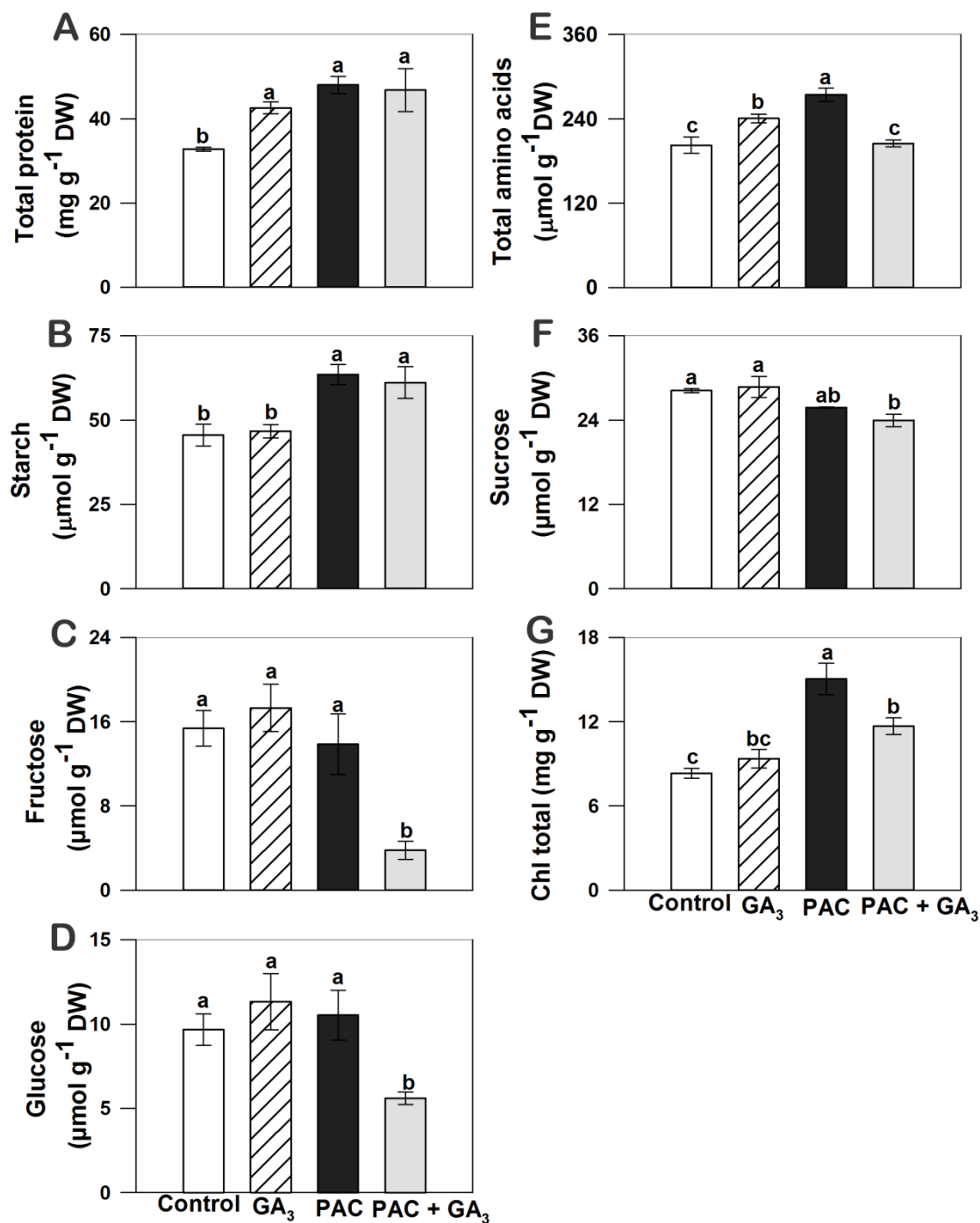


**Figura 2.** Avaliação do peso seco da planta (A), caule (B), folha (C) e raiz (D) de soja cultivada *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu$ M de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu$ M de ácido giberélico + 5.8  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) (n= 6).



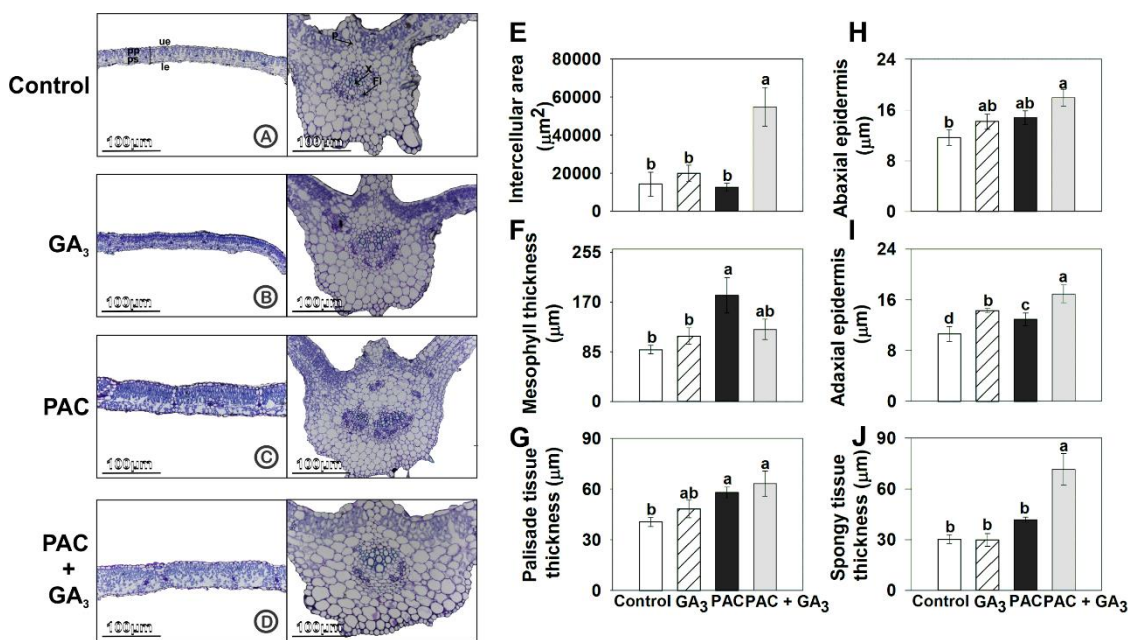
**Figura 3.** Fração de biomassa foliar (A), caulinar (B), radicular (C), razão biomassa parte aérea:raiz (D), comprimento do caule (E), diâmetro do caule (F), área foliar (G) e área foliar específica (H) em soja cultivada *in vitro* após tratamento com : meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle),  $5.8 \mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ),  $5.1 \mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC),  $5.8 \mu\text{M}$  de ácido giberélico +  $5.1 \mu\text{M}$

de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) (n= 6).

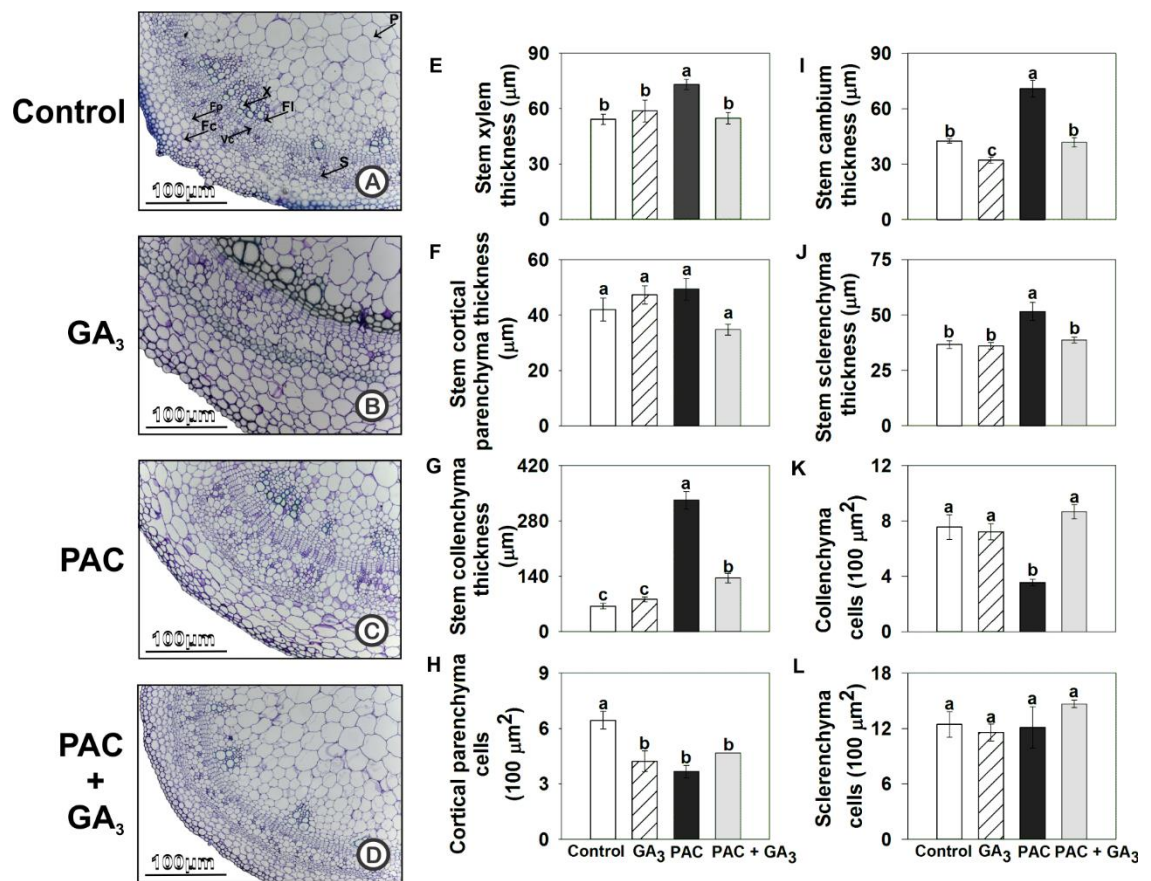


**Figura 4.** Metabolismo primário da parte aérea de soja cultivada *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle),

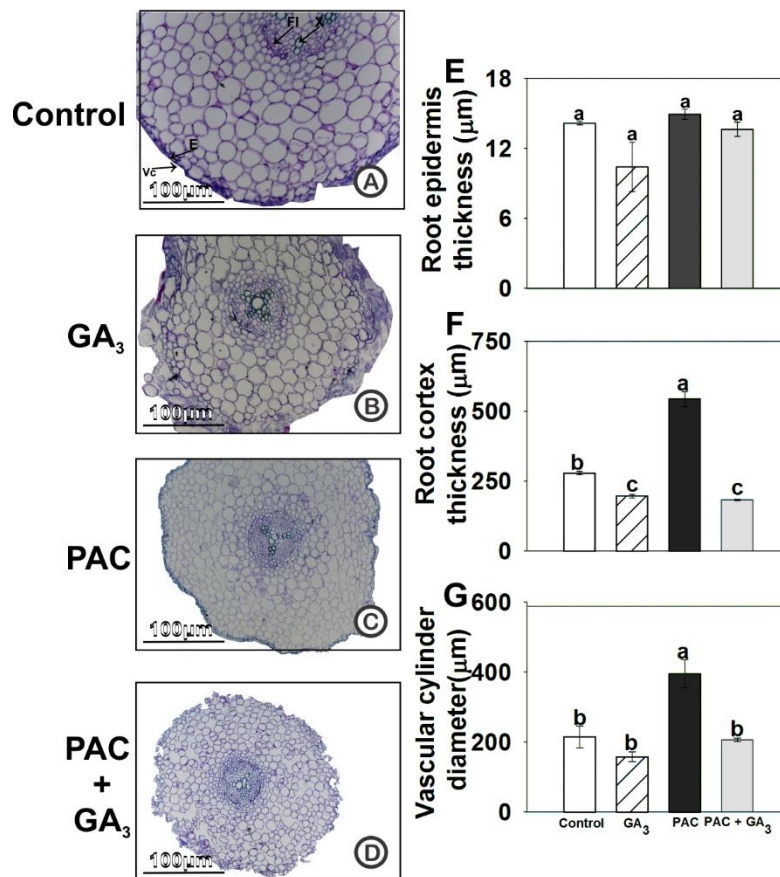
5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+ $\text{GA}_3$ ). A: proteínas totais; B: amido; C: frutose; D: glicose; E: aminiácidos totais; F: sacarose; G: clorofilas totais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).



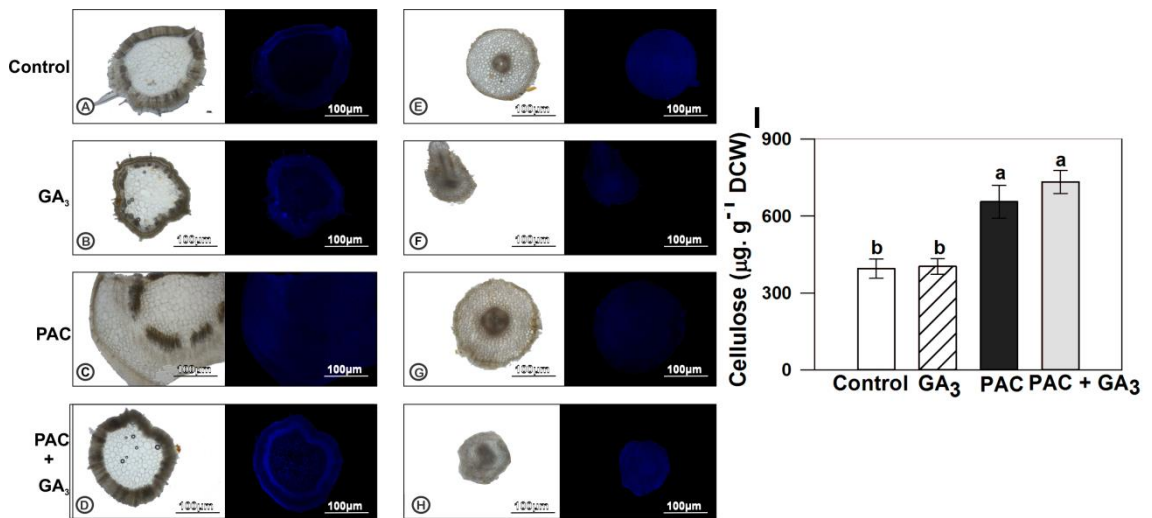
**Figura 5.** Anatomia foliar e análise quantitativa dos cortes anatômicos em soja cultivada *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+ $\text{GA}_3$ ). A-D: limbo e a nervura foliar mediana corada com azul de toluidina 0,05%; E-J: medidas de área e de espessura das estruturas do limbo foliar. Legenda: pp, parênquima paliçádico; ps, parênquima esponjoso; ue, face abaxial; le, parênquima esponjoso; x, xilema; fl, floema; en, endoderme; p, periderme. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).



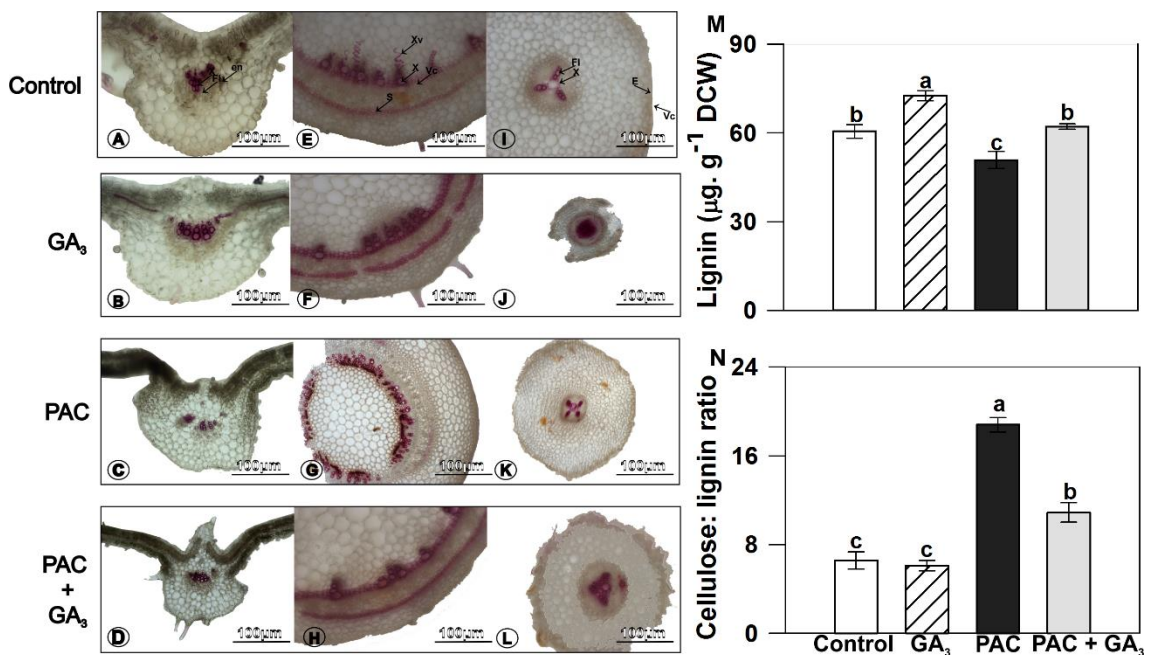
**Figura 6.** Anatomia do caule e análise quantitativa dos cortes anatômicos em soja cultivada *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8 μM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1 μM de paclobutrazol (PAC), 5.8 μM de ácido giberélico + 5.1 μM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A-D: cortes transversais do caule corados com azul de toluidina 0,05%. E-L: medidas de espessura e contagem do número de células no caule. Legenda: P, parênquima da medula do caule; X, xilema; Fl, floema; S, esclerênquima; Vc, câmbio vascular; Fp, células do parênquima fundamental; Fc, células do colênquima fundamental. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05) (n=3).



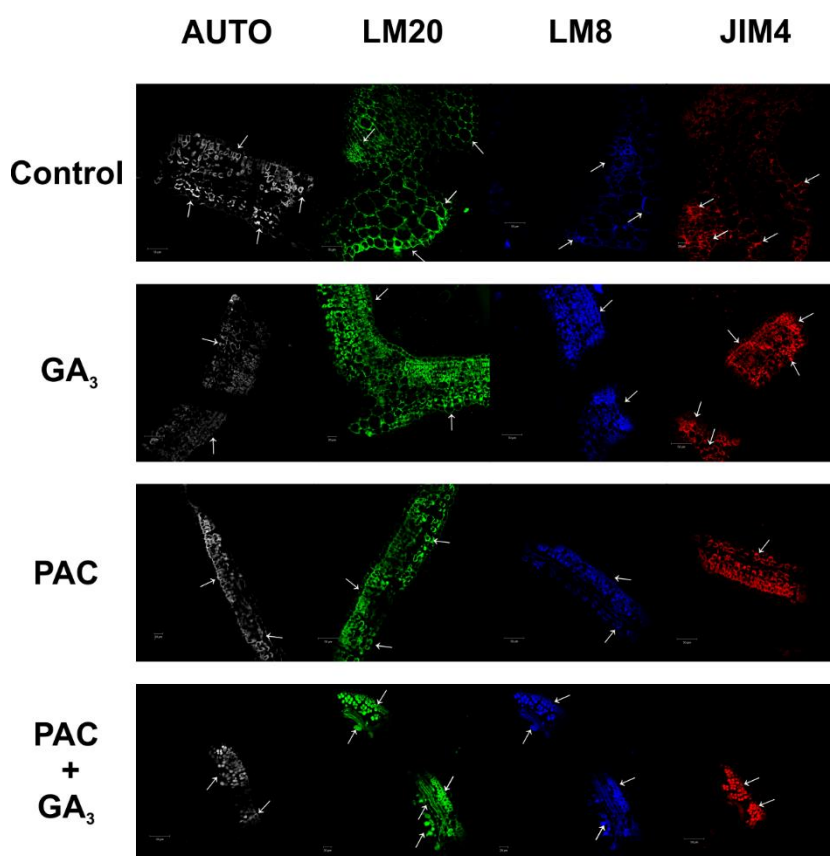
**Figura 7.** Anatomia da raiz e análise quantitativa dos cortes anatômicos em soja cultivada *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8 µM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1 µM de paclobutrazol (PAC), 5.8 µM de ácido giberélico + 5.1 µM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A-D: cortes transversais da raiz principal corados com azul de toluidina 0,05%. E-G: medidas de espessura e contagem do número de células na raiz. Legenda: X, xilema; Fl, floema; Vc, câmbio vascular. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) ( $n=3$ ).



**Figura 8.** Histolocalização de celulose por microscopia de fluorescência em soja cultivada *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8 µM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1 µM de paclobutrazol (PAC), 5.8 µM de ácido giberélico + 5.1 µM de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). A-D: cortes transversais do caule: esquerda (não corados microscópio óptico); direita (corados com Calcofluor White – microscopia de fluorescência); E-H: cortes transversais de raiz: esquerda (não corados – microscopia de luz); direita (corados com Calcofluor White – microscopia de fluorescência); Cor azul indica reação positiva do Calcofluor White com a celulose. I: Teor de celulose na parede celular do caule e da raiz. Setas brancas indicam regiões de maior intensidade de fluorescência. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) (n=3).

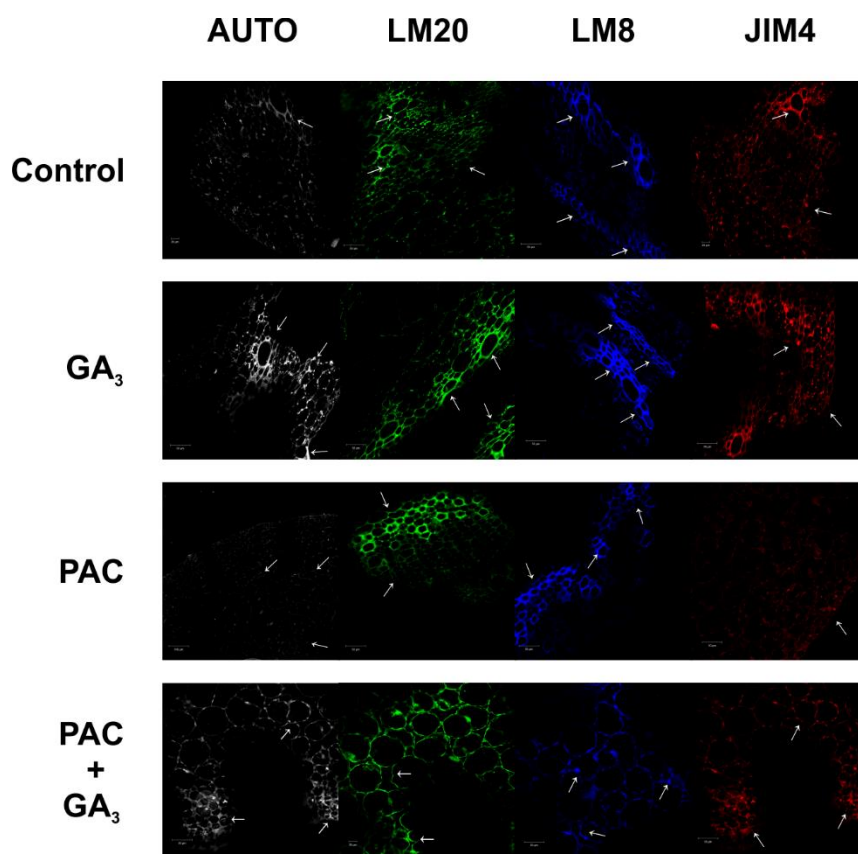


**Figura 9.** Histolocalização de lignina por microscópio óptico em folha (A-D), caule (E-H) e raiz (I-L) de soja cultivada *in vitro* após tratamento com: cultivada *in vitro* submetidas aos seguintes tratamentos: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu$ M de ácido giberélico ( $GA_3$ ), 5.1  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu$ M de ácido giberélico + 5.1  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC+ $GA_3$ ). Cortes transversais da nervura mediana da folha (A-D), caule (E-H) e raiz (I-L), corados com Floroglucina ácida (coloração vinho indica reação positiva com o corante); M: análise do conteúdo de lignina na parede celular da parte aérea de soja. N: razão de celulose e lignina na parede celular. Legendas: folha- x, xilema; fp, parênquima fundamental; fc, colênquima; fl, floema; e, epiderme; en, endoderme; P, parênquima medular; p, periderme. vc, câmbio vascular; s, esclerênquima. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) (n=3).

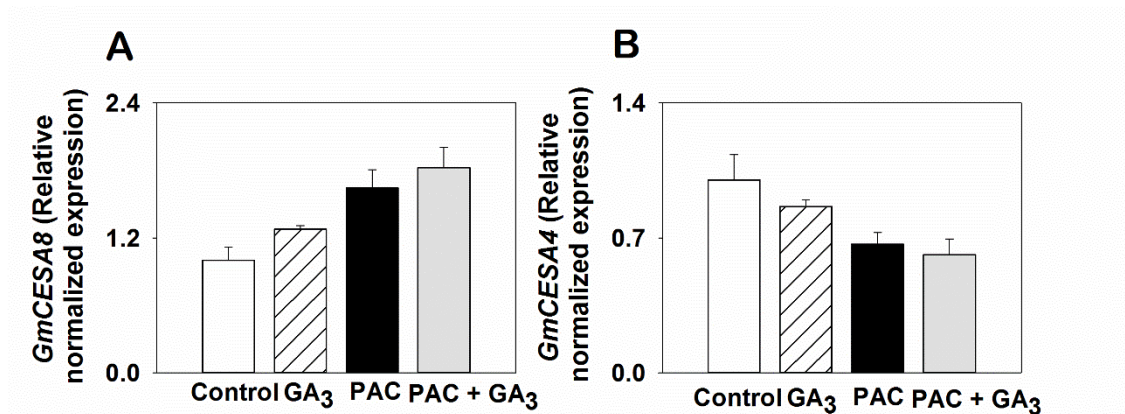


**Figura 10.** Microscopia confocal utilizando o fluoróforo FITCH para avaliação de fluorescência da folha de soja cultivada *in vitro* submetidas aos seguintes tratamentos: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu$ M de ácido giberélico ( $GA_3$ ), 5.1  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu$ M de ácido giberélico + 5.1  $\mu$ M de paclobutrazol (PAC+ $GA_3$ ). Legenda: Auto, controle negativo da fluorescência (auto-fluorescência da folha); LM20, anticorpo monoclonal da parede celular para homogalacturonano; LM8, anticorpo monoclonal da parede celular para

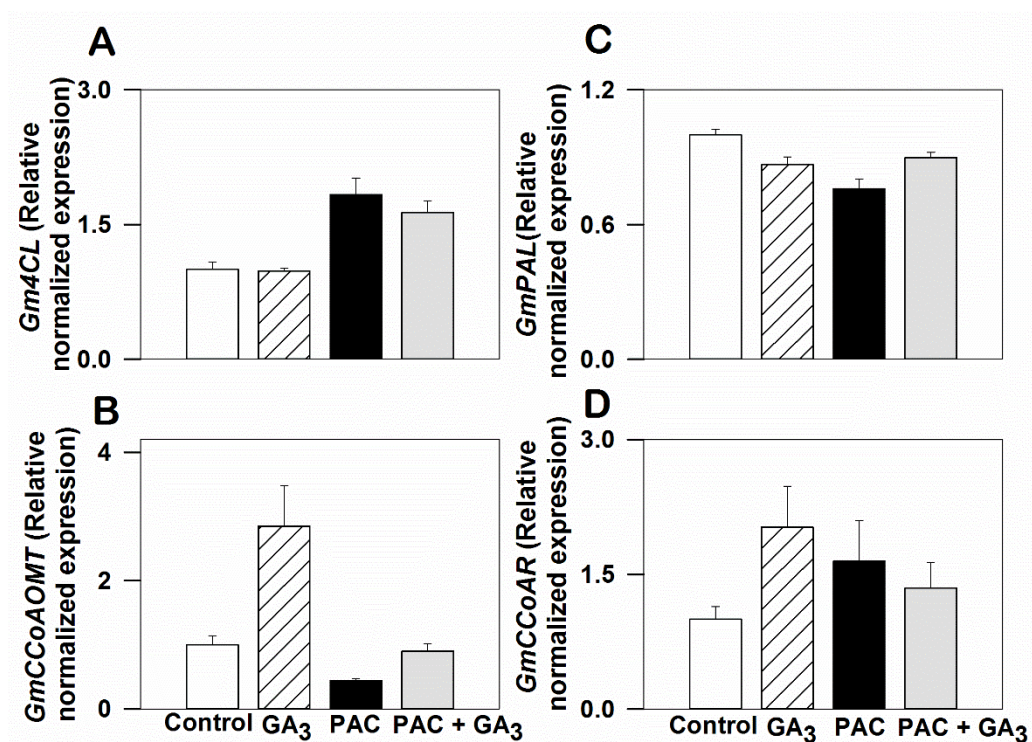
xilogalacturonano JIM4, anticorpo monoclonal da parede celular para glicoproteína arabinogalactana.



**Figura 11.** Microscopia confocal utilizando o fluoróforo FITCH para avaliação de fluorescência do caule em soja cultivada *in vitro* submetidas aos seguintes tratamentos: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Legenda: Auto, controle negativo da fluorescência (auto-fluorescência da folha); LM20, anticorpo monoclonal da parede celular para homogalacturonano; LM8, anticorpo monoclonal da parede celular para xilogalacturonano JIM4, anticorpo monoclonal da parede celular para glicoproteína arabinogalactana.



**Figura 12.** Análises da expressão relativa (RT-qPCR) de dois genes envolvidos na biossíntese de celulose em soja cultivadas *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Médias indicadas por asterisco diferiram do controle pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).



**Figura 13.** Análises da expressão relativa (RT-qPCR) de quatro genes envolvidos na biossíntese de lignina em soja cultivadas *in vitro* após tratamento com: meio MS com sais e vitaminas sem adição de reguladores de crescimento (controle), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC), 5.8  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico + 5.1  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol (PAC+GA<sub>3</sub>). Médias indicadas por asterisco diferiram do controle pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

## 5 Discussão

Neste estudo a regulação dos níveis de GAs, controladas por GA<sub>3</sub> e PAC, em soja cultivada *in vitro* gerou alterações na morfologia da folha, caule e raiz, e adicionalmente alterou o metabolismo de compostos primários assim como de celulose e lignina. Uma das principais modificações ocorreu no padrão de crescimento e na partição de biomassa por órgãos, tendo em vista que o cultivo da soja *in vitro* com PAC também resultou em alterações mais intensificada no caule como menor peso seco e comprimento.

A massa seca foliar foi modificada, visto que a aplicação de PAC em meio de cultura induziu maior acúmulo de biomassa na folha, enquanto a suplementação de GA<sub>3</sub> *in vitro* diferentemente do cultivo *ex vitro* resultou em menor biomassa nas folhas, além de fração de massa e área foliar reduzida. Essas alterações não podem ser atribuídas as modificações na anatomia da folha, pois as mesmas variações geradas com GA<sub>3</sub> foram observadas nos demais tratamentos. O desenvolvimento da folha é regulado por uma série de fatores de transcrição, genes e sinalizações hormonais para manutenção do meristema apical (Wang & Li 2008). É possível que o fornecimento de GA<sub>3</sub> tenha interferido de duas maneiras na expansão e desenvolvimento foliar. Níveis excessivos do hormônio disponibilizado em meio de cultura podem ter gerado *feedback* negativo com a produção de isoformas como *GA 2-OXIDASE* catabolizando GAs biologicamente ativas e formando inativas como GA<sub>8</sub> (Ubeda-Tomás et al. 2006; Nam et al. 2017), e conseqüentemente diminuindo o crescimento das folhas. Uma outra alternativa para menor desenvolvimento foliar com a aplicação de GA<sub>3</sub> pode estar relacionado com a morfogênese da folha. A manutenção do meristema apical e iniciação dos primórdios foliares é parcialmente regulada pelos fatores de transcrição *KNOTTED1-like homeobox* (*KNOX*) e por GAs, em que o desequilíbrio da homeostase destes dois fatores como a aplicação de GA<sub>3</sub> pode afetar o formato da folha (Fleet & Sun 2005).

As modificações no crescimento do caule através do maior alongamento e da maior quantidade de biomassa acumulada nesse órgão são características comuns encontradas em tratamentos com elevada concentração de GAs em plantas (Binenbaum et al. 2018). Apesar do cultivo com GA<sub>3</sub> na soja *in vitro* ter induzido maior alocação de

massa e de comprimento no caule do que no tratamento com PAC, com relação ao controle estas modificações se mantiveram semelhantes. O GA<sub>3</sub> suplementado simultaneamente com PAC também promoveu o efeito de reversão no comprimento e na massa acumulada no caule, mas não resultou em uma modificação que se equiparassem a aplicação de GA<sub>3</sub> isolado, padrão de resposta observada no cultivo *ex vitro*.

O crescimento do caule é iniciado na região sub-apical do meristema denominada zona de diferenciação dando origem a células da medula, epiderme, córtex e tecidos vasculares (Serrano-Mislata & Sablowski 2018). Estas zonas de diferenciação são consideradas os locais de estímulo ao crescimento por giberelinas a partir da degradação de proteínas DELLA (Serrano-Mislata & Sablowski 2018). No meristema apical também se inicia a formação dos primórdios foliares e posterior transição de crescimento com característica indeterminada para determinada por regulação hormonal citocininas e GAs (Byerne 2012). Dayan et al. 2012 mostraram que as folhas são essenciais para o acúmulo de giberelinas bioativas promovendo a manutenção do alongamento do caule, diferenciação do xilema e câmbio vascular. Tendo em vista que a suplementação com GA<sub>3</sub> no cultivo *in vitro* da soja resultou em menor fração e área foliar, seria a redução no crescimento foliar uma justificativa para o alongamento do caule não ter sido superior a condição normal da soja cultivada *in vitro* com GA<sub>3</sub>.

Na raiz, a suplementação com GA<sub>3</sub> *in vitro* gerou alterações no desenvolvimento do órgão mais intensificadas do que na aplicação *ex vitro* na soja que resultou em menor fração de biomassa acumulada no órgão entre os tratamentos. As variações na massa foliar, do caule e da raiz justificam a menor razão da parte aérea em relação ao sistema radicular no tratamento com GA<sub>3</sub>. A aplicação de GA<sub>3</sub> em meio de cultura, mantendo o contato direto com o sistema radicular da soja cultivada *in vitro* promoveu modificações distintas ao cultivo *ex vitro*. De acordo com Tanimoto (2012) a sensibilidade da raiz é maior do que no caule, em que concentrações de GAs superiores à 1 µM beneficiam o alongamento do caule enquanto prejudicam o crescimento da raiz.

As alterações morfológicas resultaram de respostas diferenciadas no acúmulo de massa seca na parte aérea e na raiz, assim modificações no metabolismo primário na soja cultivada *in vitro*. Além de suplementação direta de carbono por sacarose, as

concentrações de glicose, frutose e sacarose permaneceram em níveis elevados na maior parte dos tratamentos, exceto no PAC + GA<sub>3</sub>. Neste tratamento, possivelmente a menor concentração de sacarose, glicose e frutose durante o cultivo *in vitro* da soja pode ter sido ocasionado para sustentar o reestabelecimento do crescimento celular através da indução da expansão foliar e crescimento radicular (Wiese et al. 2007; Paparelli et al. 2013).

A aplicação de PAC isoladamente ou em conjunto com GA<sub>3</sub> induziu menor consumo de amido. Em plantas cultivadas apenas com PAC, essa resposta pode ter sido resultante do menor acúmulo de biomassa na parte aérea. O cultivo da soja no tratamento de reversão reestabeleceu em grande parte o crescimento comparado às plantas tratadas apenas com PAC, aumentando o consumo de carbono pela conversão de frutose e glicose, assim como o consumo de sacarose disponibilizada no meio de cultivo.

Apesar do amido ser uma fonte de carbono de reserva disponível, ele não foi prontamente utilizado como os açúcares durante o dia. Talvez esta resposta seja ocasionada por atraso na síntese de degradação do amido no cultivo em fotoperíodo de 8h de escuro e 16 h de luz (Stitt & Zeeman 2012). O aumento no conteúdo de Chl total na redução de GAs via PAC pode ser decorrente do acúmulo de massa seca na folha e da estrutura da anatomia foliar. Sojas cultivadas *in vitro* com PAC tiveram a espessura foliar acentuada comparado aos demais tratamentos, assim como da espessura do parênquima paliádico (apenas PAC) e esponjoso (PAC+GA<sub>3</sub>). A aplicação de PAC induz adaptações fenotípicas características às condições de alta luz como folhas mais espessas, maior conteúdo de clorofilas e maior alongamento das células do parênquima (Falcioni et al. 2017).

O caule da soja cultivada *in vitro* também apresentou alterações no padrão de desenvolvimento estrutural ocasionado pela regulação de GAs, como maior espessura do xilema e esclerênquima com aplicação de PAC. GAs seriam responsáveis na diferenciação do xilema, vasos e fibras (Eriksson et al. 2000; Tonn & Greb 2017; Wang et al. 2017; Falconi et al. 2018). Além disso, a aplicação de PAC resultou em incrementos na espessura do câmbio vascular, que dá origem ao xilema e ao floema através do crescimento radial e longitudinal (Tonn & Greb 2017). No cultivo *in vitro* da soja com PAC, outra alteração observada foi o aumento da espessura do colênquima, mas com

redução no número de células no tecido. Dentre os mecanismos de ação gerados pela GAs, a regulação do alongamento do caule nas regiões dos entrenós a partir de divisões celulares longitudinal é uma delas (Hedden & Sponsel 2015). Como o PAC reduz os níveis através da inibição de um dos intermediários da biossíntese de GAs, o número de divisões celulares também foi reduzido. O crescimento celular, no entanto, foi mantido no sentido radial, explicando a redução no número de células do colênquima, mas com aumento de espessura. O colênquima é um tecido característico de suporte de plantas herbáceas e arbóreas, muito comum em eudicotiledôneas sendo considerado como de crescimento primário tendo em vista sua flexibilidade (Leroux 2015). A limitação de GAs provocaria adaptações na organização da estrutura anatômica do caule da soja cultivada *in vitro*, que induziria aumento do crescimento primário. Modificações anatômicas similares ao do caule na raiz da soja mostraram que a espessura do córtex foi aumentada por maior volume celular do parênquima e aumento do diâmetro do cilindro vascular.

Para avaliar como a composição química da parede celular estava sendo alterada com a regulação dos níveis de GAs na soja, análises histoquímicas e a avaliação de concentração de celulose e lignina foram realizadas. O cultivo com PAC induziu aumento da concentração de celulose na parede celular da soja *in vitro*. A parede celular primária é estruturada com microfibrilas de celulose embebidas em um complexo matriz de polissacarídeos como pectinas e hemiceluloses (Cosgrove 2005). A análise histoquímica da parede celular permitiu visualizar que a composição da parede celular com celulose é maior em todos os tecidos do caule da soja quando cultivada com PAC. Apesar de sido observado aumento na expressão dos genes envolvidos na biossíntese de celulose, pode ter ocorrido o aumento de atividade de enzimas do metabolismo de açúcares que tenha induzido o aumento do conteúdo de celulose. Uma possibilidade seria a maior atividade da sacarose sintase (*SUS*) que faz parte das enzimas do citosol que disponibilizam carbono para o complexo CESAs através da conversão de sacarose em UDP-glicose, que posteriormente é utilizada para polimerização em cadeia de  $\beta$ - 1,4 glucanos (Endler & Persson 2011). Fato que pode ter acontecido devido a disponibilização de sacarose em

meio de cultivo, além de menor necessidade de utilização deste carbono para alocação de biomassa, e conseqüentemente maior crescimento em plantas tratadas com PAC.

A parede secundária é constituída por celulose, hemicelulose, e lignina que são depositadas principalmente em células especializadas como elementos traqueais, fibras e esclerênquima (Zhong & Ye 2014). Na análise histoquímica para detecção de lignina foi possível observar que no meio de cultura suplementado com GA<sub>3</sub> ocorreu maior lignificação na folha, raiz e caule (xilema, esclerênquima e câmbio vascular), enquanto que na suplementação com PAC a lignificação foi reduzida. Tal como argumentado anteriormente, o papel das GAs na indução e formação de fibras já era reconhecido (Dayan et al. 2012), e esta característica se confirmou durante o cultivo *in vitro* da soja. A sinalização para formação de lignina na parede celular seria realizada por GAs em alguns pontos da rota dos fenilpropanoídes, através dos genes *GmCCoAOMT* e *GmCCoAR* (Bonawitz & Chapple 2010).

Na análise de imunolocalização a folha foi modificada na composição de xiloglucanos na parede primária principalmente no tratamento com GA<sub>3</sub>, que através da auto-fluorêscencia parece estar ligado as microfibrilas de celulose na região do parênquima paliçádico e esponjoso. Enquanto que no tratamento com PAC a presença de xiloglucanos no limbo foliar ficou mais concentrada no parênquima paliçádico. No caule, xiloglucanos aparentemente contribuíram com toda a espessura da parede celular, exceto na condição de reversão. Xiloglucanos são hemiceluloses abundantes na composição da parede celular primária, sendo considerados os responsáveis por induzir a ligação cruzada das microfibrilas de celulose (Cosgrove, 2005). A ligação não-covalente entre as microfibrilas de celulose e xiloglucanos determinam a maior parte das propriedades físicas da parede celular (Cosgrove 2005). Desta forma é possível inferir que as folhas tiveram maior alteração na composição da parede celular primária em xiloglucanos do que no caule.

O caule da soja alterou a composição estrutural da parede celular em função da regulação dos níveis de GAs. As regiões que compreendem o colênquima e o parênquima no caule, tiveram maior constituição na espessura por homogalacturonas na redução dos níveis de GAs. Homogalacturona é um dos representantes das pectinas, grupos de

polissacarídeos complexos ricos em ácido galacturônico (Gal-A) que compõem cerca de 35% do peso seco da parede celular primária (Hocq et al. 2017). Na folha as homogalacturonas tiveram maior participação na constituição da parede celular na aplicação de GA<sub>3</sub>.

Arabinogalactanas consistem em uma classe de glicoproteínas da superfície celular (AGP), a qual fazem parte do complexo de pectinas (Cosgrove 2005). A presença de epítomos de carboidratos AGP e ligações peptídicas de AGP sugerem que a possível participação no espessamento e associação que constitui maior rigidez na indução de crescimento secundário (Seifert & Roberts 2007). A ativação destas glicoproteínas aparentemente está correlacionada com a regulação dos níveis de GAs na composição da parede celular da folha na soja. A imunolocalização por AGP foi bem característica no caule de plantas tratadas com GA<sub>3</sub>, e provavelmente a presença destes epítomos de carboidratos AGP sugerem participação no espessamento da parede celular de células do caule (Seifert & Roberts 2007).

## **6 Conclusão**

Atualmente devido as necessidades de sustentar uma agricultura comercial que visa constantemente o desenvolvimento de novas cultivares, ferramentas que possibilitem otimizar custos, tempo e espaço são requeridas. A cultura de tecidos de plantas consiste em uma ferramenta facilitadora da biologia vegetal, biotecnologia na engenharia e melhoramento de plantas. Neste trabalho, o uso da cultura de tecidos no cultivo *in vitro* da soja possibilitou avaliação de diversas características do crescimento e desenvolvimento da cultura com o uso de reguladores de crescimento em um curto espaço de tempo, sem que ocorresse interferência de fatores bióticos e abióticos.

O aumento da disponibilidade de GAs para o crescimento da soja a partir da suplementação de GA<sub>3</sub> induziu o alongamento e acúmulo de biomassa no caule, além de modificações na anatomia do órgão que levaram a maior produção e deposição de lignina na parede celular secundária. A morfogênese na planta, provavelmente foi regulada negativamente pelo excesso do hormônio, uma vez que a expansão foliar e a biomassa da

raiz foram amplamente reduzidas. De modo contrário, a aplicação de PAC reduziu a biomassa e o comprimento do caule, mas beneficiou em maior massa seca na folha e na raiz. A composição da parede celular de plantas tratadas com PAC também foi modificada, mas na biossíntese de celulose, sendo as características dos tecidos estruturais mais relacionados a formação de parede celular primária.

Além disso, foi observado que a regulação dos níveis de GAs interferiu diretamente no metabolismo primário da soja, sendo possivelmente o metabolismo de açúcares o mais influenciado. No entanto, ressalta-se a necessidade de novos estudos que possam elucidar possíveis lacunas ainda não preenchidas.

## 7 Referências

ACKER, V. R. et al. Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 46, 2013.

AVCI, U. et al. Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: immunolocalization of glycan epitopes. In: **Biomass Conversion**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 73-82.

ALTPETER, F. et al. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.

BINENBAUM, J. et al. Gibberellin Localization and Transport in Plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n 5, p. 410-421, 2018.

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 337-363, 2010.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850, 2005.

CRUZ, C.D. GENES—A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276. 2013.

DAYAN, J. et al. Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. **The Plant Cell**, p. tpc. 111.093096, 2012.

ENDLER, A.; PERSSON, S. Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 4, n. 2, p. 199-211, 2011.

ERIKSSON, M. E. et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 784, 2000.

ESPINOSA-LEAL, C. A.; et al. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, p. 1-18, 2018.

FALCIONI, R. et al. Distinct growth light and gibberellin regimes alter leaf anatomy and reveal their influence on leaf optical properties. **Environmental and Experimental Botany**, v. 140, p. 86-95, 2017.

FALCIONI, R. et al. Increased gibberellin levels enhance light capture efficiency in tobacco plants and promote dry matter accumulation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 30, n. 3, p. 235-250, 2018.

FOSTER, C. E. et al. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part II: carbohydrates. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 37, 2010 (a).

FOSTER, C. E. et al. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part I: lignin. **Journal of Visualized Experiments**, n. 37, 2010 (b).

GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 32, n. 4, p. 272-289, 1996.

GIBON, Y. et al. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3304-3325, 2004.

GU, Y.; SOMERVILLE, C. Cellulose synthase interacting protein: a new factor in cellulose synthesis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 12, p. 1571-1574, 2010.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A century of Gibberellin Research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 740-760, 2015.

HEDDEN, P.; THOMAS, S. G. Gibberellin Biosynthesis and its Regulation. **Biochemical Journal**, v. 444, n. 1, p. 11-25, 2012.

- HIMMEL, M. E. (Ed.). Biomass conversion: methods and protocols. **Humana Press**, 2012.
- HOCQ, L. et al. Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. **Trends In Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 20-29, 2017.
- HUANG, et al. A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. **The Plant Cell**, v. 27, n. 6, p. 1681-1696, 2015.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **McGraw-Hill Book Company, Inc.**; London, 1940.
- KAMRAN, M. et al. Effect of paclobutrazol, a potential growth regulator on stalk mechanical strength, lignin accumulation and its relation with lodging resistance of maize. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 317-332, 2018 (a).
- KAMRAN, M. et al. Application of paclobutrazol: a strategy for inducing lodging resistance of wheat through mediation of plant height, stem physical strength, and lignin biosynthesis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 29, p. 29366-29378, 2018 (b).
- LEROUX, O. Collenchyma: a versatile mechanical tissue with dynamic cell walls. **Annals of Botany**, v. 110, n. 6, p. 1083-1098, 2012.
- LIU, C. et al. Shortened basal internodes encodes a gibberellin 2-oxidase and contributes to lodging resistance in rice. *Molecular plant*, v. 11, n. 2, p. 288-299, 2018.
- MARTINS, A. O. et al. Differential root and shoot responses in the metabolism of tomato plants exhibiting reduced levels of gibberellin. **Environmental and Experimental Botany**, v. 157, p. 331-343, 2019.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PAPARELLI, E. et al. Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in Arabidopsis. **The Plant Cell**, p. tpc. 113.115519, 2013.
- PENG, D. et al. Lodging resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.): Lignin accumulation and its related enzymes activities due to the application of paclobutrazol or gibberellin acid. **Field Crops Research**, v. 157, p. 1-7, 2014.
- RIBEIRO, D. M. et al. Action of gibberellins on growth and metabolism of Arabidopsis plants associated with high concentration of carbon dioxide. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1781-1794, 2012 (a).

- RIZZA, A.; JONES, A. M. The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 9-15, 2019.
- SAAD, A. I. M.; ELSHAHED, A. M. Plant tissue culture media. in: **Recent Advances In Plant In Vitro Culture**. InTech, 2012.
- SCHRÖDER, F. et al. Consequences of induced brassinosteroid deficiency in Arabidopsis leaves. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 309, 2014.
- SEIFERT, G. J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review Plant Biology**, v. 58, p. 137-161, 2007.
- SILVA, F. et al. **Soybean Breeding**. Vicosia: Springer, 2017.
- STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 282-292, 2012.
- SULPICE, R. et al. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10348-10353, 2009.
- TANIMOTO, E. Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin. **Annals of Botany**, v. 110, n. 2, p. 373-381, 2012.
- THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.
- TONN, N.; GREB, T. Radial plant growth. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R878-R882, 2017.
- WANG, G. et al. Exogenous gibberellin enhances secondary xylem development and lignification in carrot taproot. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 839-848, 2017.
- WIESE, A. et al. Spatio-temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. **New Phytologist**, v. 174, n. 4, p. 752-761, 2007.
- ZHONG, R.; YE, Z. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 2, p. 195-214, 2014.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A redução dos níveis de GAs com a aplicação de PAC reduziu o porte da planta, principalmente pela redução da biomassa alocada e alongamento do órgão no cultivo *ex vitro* e *in vitro*. Em contrapartida, a aplicação de GA<sub>3</sub> promoveu o efeito oposto à aplicação de PAC, sendo estas respostas menos pronunciadas no cultivo *in vitro*.
- A aplicação de PAC no cultivo *ex vitro* da soja resultou em maiores taxas fotossintéticas por aumento de trocas gasosas e eficiência nos parâmetros envolvidos na fluorescência da Chl *a*. Sendo estes fatores, possivelmente correlacionadas ao rearranjo da anatomia foliar e maior concentração de Chl totais.
- A redução de GAs para a soja cultivada *ex vitro* e *in vitro* induziu maior composição de celulose na parede celular da parte aérea da planta, enquanto o aumento induziu maior produção de lignina.
- Em ambos os cultivos, a aplicação de PAC ou GA<sub>3</sub> não resultou em respostas conclusivas a nível de expressão genica para ativação da biossíntese de celulose e lignina. Mas, provavelmente estas vias sejam reguladas pelo metabolismo primário, através de enzimas envolvidas no metabolismo de açúcares.
- A suplementação de GA<sub>3</sub> no cultivo *in vitro* da soja promoveu mecanismos regulatórios distintos, que podem estar relacionados ao catabolismo do hormônio e a interação com fatores de transcrição no meristema apical do caule. No entanto, análises de quantificação das formas inativas de GAs e da expressão dos fatores de transcrição poderiam futuramente ser realizadas.
- Como perspectivas poderiam ser sugeridos novos estudos com a UFVS 86B10 em campos experimentais para verificar se as mesmas características seriam observadas, além de avaliações como testes de resistências ao acamamento. E possivelmente, o desenvolvimento de estudos semelhantes do estado reprodutivo da planta, verificando se a partição de carbono afetaria a enchimento, formação e composição química do grão.