

**MÁRCIA FABIANA BARBOSA DE PAULA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE PLANTAS MUTANTES  
DO GENE *abc17* EM ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

**T**

**P324c  
2013**

**Paula, Márcia Fabiana Barbosa de, 1982-  
Caracterização molecular e fisiológica de plantas mutantes do  
gene*abc17* em arroz / Márcia Fabiana Barbosa de Paula. - Viçosa, MG,  
2013.**

**xi, 62 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.**

**Orientador: Moacil Alves de Souza.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 54-62.**

**1. Arroz - Genética. 2. Genética molecular. 3. Lignina. 4. Genes. 5. Ácido  
ferúlico. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.**

**CDD 22. ed. 633.182**

**MÁRCIA FABIANA BARBOSA DE PAULA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE PLANTAS MUTANTES  
DO GENE *abcb17* EM ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 22 de Novembro de 2013

---

Marcelo Ehlers Loureiro  
(Co-orientador)

---

Marcelo Rogalski

---

Viviane Guzzo de Carli Poelking

---

Andrea Giordano

---

Moacil Alves de Souza  
(Orientador)

## **OFEREÇO E DEDICO**

Aos meus exemplos de vida, meus pais Enio e Eliane.  
A eles que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui,  
Sempre me dando força, me apoiando em cada tropeço,  
Amo vocês infinitamente,  
Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força que me concebeu em toda essa etapa, sempre me iluminando e me protegendo com seu eterno amor. Obrigada Deus por te conhecer melhor a cada dia e te sentir ao meu lado mais e mais, aumentando a minha fé e perseverança. "Senhor, eu creio mais aumentai a minha fé".

À Universidade Federal de Viçosa, e em especial ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade, e a coordenação pelo auxílio. A todos os professores que contribuíram com aulas práticas e teóricas para meu desenvolvimento científico.

Aos participantes da banca de defesa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Co-orientador, na verdade no papel de orientador, Prof. Marcelo Loureiro, um verdadeiro anjo da minha vida, sempre confiando, apoiando e dando oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente. À sua família linda.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal por disponibilização do ambiente físico.

Aos funcionários Maria Mercês, Carlos Raimundo e Toninho por todo apoio.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado-sanduiche.

À Universidade de Purdue pelo acolhimento.

Ao Prof. Angus Murphy, responsável pela minha coorientação no doutorado sanduíche, pela oportunidade. Aos colegas de trabalho do laboratório do departamento de Horticultura da Universidade de Purdue, Indiana/EUA.

Aos amigos feitos nesse período de doutorado sanduíche, que independente da distancia estarão sempre no meu coração, agradeço sempre pelo carinho, amor, suporte em todos os momentos que passei em Lafayette/West Lafayette, em especial Kátia, Júnior, Pedrinho; Cindy, Ally e Sabrina; Sandra, Jeth, Patty, Amanda; Eli, Juju, James, Dani. Aos meus queridos amigos Nathy, Marco, Mamita, André, Viviane e muitos outros que estiveram ao meu lado, sempre torcendo por mim, obrigada pelo convívio.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal Molecular de Viçosa, Viviane, Rose, Ana Carla, Giuliana, Carla, Andrea, Bárbara, Camilo, Fernanda, Mirelli, Alice, Danilo, e todos que tive o prazer do convívio.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Dani, Bel, David, Henrique, Franklin, Biá, Aline Bahia, Rebeca, Samuel, dentre outros.

As minhas queridas amigas de Viçosa, Vivi, Ana Carla, Giu pelo apoio, amizade e carinho. Vocês fazem parte desse trabalho, não se como iria concluir sem a ajuda de vcs.

A duas pessoas muito especiais que me apoiaram quando cheguei a Viçosa, Ana Marina de Abreu e Larissa Vescovi.

As minhas amigas de mestrado, em especial a Nádía e Brendinha, que sempre torceram por mim. Aos meus amigos de graduação que sempre estão mandando pensamentos positivos.

À D. Lourdes e Sr. João pelo apoio e carinho. E ao meu amor David, pela força, apoio, confiança para seguir nessa caminhada.

A todos os membros da minha família, que sempre me deram força, em especial minhas avós, Raimunda e Maria José que mesmo não entendendo o que eu faço, torcem pela minha felicidade. Aos meus tios, primos e todos da minha família que de alguma forma torceram por mim.

E por último e mais especial, aos meus pais, Enio e Eliane, que lutaram sempre junto comigo, com muito amor, acreditando que eu conseguiria, me dando força em todos os momentos, me apoiando incondicionalmente, fazendo o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, me incentivando a conseguir acabar essa “novela” de doutorado,

**MEU MUITO OBRIGADA!!!!**

## BIOGRAFIA

**MÁRCIA FABIANA BARBOSA DE PAULA**, filha de Enio de Paula Rosa e de Maria Eliane Barbosa, nascida em Diadema-SP no dia 29 de Novembro de 1982, viveu grande parte da sua vida em Belo Horizonte-MG onde seus pais residem até hoje. Em fevereiro de 2003 iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros, onde graduou-se no final de 2006. Em 2007 iniciou o curso de Pos Graduação em Biotecnologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em Julho de 2009, e posteriormente iniciou o curso de doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa no dia 22 de Novembro de 2013.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Ácido ferúlico .....	3
2.2 Lignina .....	4
2.3 Biossíntese da lignina .....	5
2.4 Família dos genes ABC .....	10
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental .....	13
3.2 Caracterização fisiológica .....	14
3.2.1 Determinação das trocas gasosas .....	14
3.2.2 Teor relativo de água .....	14
3.2.3 Altura da parte aérea e radicular .....	15
3.2.4 Número de perfilhos e panículas por planta .....	15
3.2.5 Análise das raízes .....	15
3.2.6 Densidade estomática .....	16
3.2.7 Massa seca .....	16
3.3 Determinação do teor de lignina .....	16
3.4 Caracterização anatômica – análise histoquímica .....	18
3.5 Extração RNA, síntese de cDNA e Real Time PCR .....	18
3.5.1 Síntese de cDNA .....	19
3.5.2 Desenho dos primers .....	19
3.5.3 Análise quantitativa da expressão dos genes .....	20
3.6 Análise estatística .....	21
<b>4 – RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 Caracterização dos mutantes .....	22
4.1.1 Alterações no gene ABCB17 promovem o crescimento aéreo e radicular em plantas de arroz .....	22

4.1.2 O número de perfilhos não é alterado e os mutantes tem florescimento precoce .....	25
4.1.3 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila não foram modificados .....	26
4.1.4 Redução na expressão do gene ABC17 aumenta o teor lignina em um específico padrão temporal e espacial .....	27
4.1.5 A expressão de alguns genes da rota da lignina foram afetados em diferentes órgãos nos mutantes abcb17 .....	29
4.2 Análise da perturbação da homeostase do metabolismo de fenilpropanóides com a adição de ácido ferúlico e PIP .....	30
4.2.1 Acréscimo de ácido ferúlico e PIP não alteram no crescimento aéreo e radicular das plantas .....	30
4.2.2 A porcentagem de lignina é alterada em alguns órgãos após o tratamento com ácido ferúlico e PIP .....	32
4.2.3 Tratamentos com ácido ferúlico e PIP alteram a expressão de alguns genes da rota dos fenilpropanóides .....	34
4.3 Efeito do estresse osmótico nos mutantes abcb17 .....	38
4.3.1 Mutantes abcb17 não apresentam alterações na resposta da morfologia das raízes ao estresse osmótico .....	38
4.3.2 Mutantes sofrem maior desidratação foliar com o estresse osmótico .....	39
4.3.3 Plantas mutantes possuem menor massa seca da parte aérea quando submetidas por 7 dias ao estresse osmótico .....	40
4.3.4 Diferenças no crescimento e desidratação foliar não são relacionadas com alterações nas trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila .....	41
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 Caracterização dos mutantes .....	45
5.2 Efeito do ácido ferúlico e PIP .....	47
5.3 Efeito do estresse osmótico .....	52
<b>6 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 – REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>54</b>

## RESUMO

**PAULA, Márcia Fabiana Barbosa de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. Caracterização molecular e fisiológica de plantas mutantes do gene *abcb17* em arroz. Orientador: Moacil Alves de Souza. Coorientador: Marcelo Ehlers Loureiro.**

O ácido ferúlico é um intermediário da síntese de siringil e guaiacil, os monolignóis mais abundantes formadores da lignina. Além disso, participa da síntese da suberina e cutícula, atuando também como intermediário na síntese de alguns flavonóides. Por meio de análises posteriores em mutantes do gene *OsABCB17*, um gene da família ABC, foi verificada a existência de um sítio de ligação diferente dos demais, indicando ser um possível transportador de ácido ferúlico. Os transportadores ABC são membros de uma família protéica que possuem a habilidade de se ligar e hidrolisar ATP como fonte de energia para dirigir o transporte através da membrana plasmática, podendo funcionar como exportadores, importadores ou canais ATP regulados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a função do gene *OsABCB17* como um possível transportador de ferulato em arroz, utilizando dois mutantes oriundos da inserção do transposon *TOS17*, por meio de análises moleculares e fisiológicas. Esses mutantes apresentaram aumento do teor da lignina na bainha fonte e na folha dreno, sem alterações em outros órgãos, porém a expressão dos genes analisados foi alterada negativamente em alguns órgãos. Em experimentos de perturbação da homeostase do metabolismo dos fenilpropanóides, por meio da adição exógena de ácido ferúlico e de ácido piperolínico (PIP), inibidor da enzima *C4H*, observamos que, enquanto em plantas WT houve uma redução da expressão dos genes *4CL2*, *COMT*, *CAD2* e *PAL* em vários órgãos, nos mutantes, ou não houve alteração, ou menos genes foram afetados. Esses dados sugerem que a falta de uma correlação entre o teor de lignina e a expressão dos genes pode ser explicada pela complexidade da via, ou simplesmente pelo fato desse transportador estar envolvido em outro tipo de via, como a da suberina, a qual possui sua formação similar a da lignina. Os efeitos positivos observados no crescimento da parte aérea e radicular nos mutantes, provavelmente são devidos à redução da alocação do carbono na síntese de lignina ou suberina, aumentando assim a disponibilidade de energia para o crescimento. Entretanto, a redução da expressão do gene *OsABCB17* teve efeitos negativos, tornando as plantas mais sensíveis ao estresse osmótico, provavelmente devido a uma desidratação resultante da redução do acúmulo de suberina e cutícula nas células epidérmicas e subepidérmicas, ou por meio da redução da

absorção de água e/ou da condutividade do xilema. Porém, outros estudos precisam ser realizados nestas plantas mutantes no intuito de obter evidências diretas para fundamentar as hipóteses levantadas nesse trabalho.

Palavras-chave: Lignina, Genes ABC, ácido ferúlico

## ABSTRACT

**PAULA, Márcia Fabiana Barbosa de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2013. Molecular and physiological characterization of mutants plants *abc17* in rice. Adviser: Moacil Alves de Souza. Co-adviser: Marcelo Ehlers Loureiro.**

Ferulic acid is an intermediate in the synthesis of syringyl and guaiacyl, the most abundant monolignol precursor of lignin. The ferulic acid participates in the synthesis of suberin and cuticle, as well as acts as an intermediary for the synthesis of some flavonoids. Through further analysis in the *OsABCB17* mutant, a gene of the ABC family, was verified the existence of a different site of connection indicating to be a possible carrier of ferulic acid. The ABC transporters are members of a protein family with ability to bind and hydrolyze ATP. The ATP is used as source of energy to drive the transport across the plasma membrane and may function as exporters, importers or ATP channels regulated (maybe ATP regulated channel). Thus, the aim of this study was to analyze the function of *OsABCB17* gene as a possible ferulate transporter in rice, using two mutants derived from the insertion of the *Tos17* transposon, by molecular and physiological analysis. These mutants showed an increase of lignin content in the source sheath and in the sink leaf blade without changes in other organs, the two mutants have an increase of lignin content in but the expression of the analyzed genes was negatively altered in some organs. (este paragrafo esta different do original, mas faz sentido aqui) In experiments of disturbance of metabolic homeostasis of phenylpropanoids, through the addition of exogenous ferulic acid and piperonylic acid (PIP), C4H enzyme inhibitor, it was observed that while in WT plants there was a reduction of the expression of *4CL2*, *COMT*, *CAD2* and *PAL* genes in various organs, in mutants, either no change or fewer genes were affected. The data suggest that the lack of correlation between the lignin content and the expression of the genes can be explained by the complexity of the pathway, or simply the fact that the carrier is involved in other type of pathways, such as the suberin, which formation is similar to the lignin. The positive effects in shoot and roots growth are probably due to the reduction of carbon allocation in lignin and suberin biosynthesis, thereby increasing the availability of energy for growth. However, the reduction of the expression of the *OsABCB17* gene had negative effects, making the plant more sensitive to osmotic stress, probably due to dehydration resulting from the reduction of the accumulation of suberin and cuticle in epidermal and subepidermal cells, or due to the reduction in water uptake and/or

xylem hydraulic conductivity. However, other studies are needed in these mutant plants to obtain direct evidence to support the hypotheses raised in this work.

Keywords: Lignin, ABC genes, ferulic acid

## 1 - INTRODUÇÃO

A lignina é uma das mais importantes biomoléculas em plantas vasculares. Ela é composta por diferentes combinações de monolignóis, possuindo o ferulato em sua estrutura, e é envolvida na estrutura de suporte, transporte de água e nutrientes, dentre outras funções (Higuchi T, 2006; Boerjan *et al.*, 2003). Esse ácido ferúlico, pode ao mesmo tempo ser esterificado com polissacarídeos da parede celular, incorporados dentro da estrutura da lignina, ou formar pontes que conectam a lignina com polissacarídeos de parede. Vários são os tipos de transporte que podem ocorrer, e um deles é definido como bomba de monolignol  $\rho$ -coumaryl através da membrana plasmática, realizado com a ajuda de transportadores da família ABC – *ATP binding cassette* (Alejandro *et al.*, 2012; Sibout & Hofte, 2012).

Os genes da subfamília ABC são um dos mais importantes transportadores em microrganismos, plantas e animais. Compreende transportadores de membrana e proteínas solúveis envolvidas em uma ampla variedade de processos, muito dos quais são considerados potenciais na área agrícola, biotecnológica e médica (Verrier *et al.*, 2008). Em plantas, esses transportadores possuem função na excreção de proteínas para fora da célula e para dentro do vacúolo, acúmulo de metabólitos secundários (Shitan *et al.*, 2003), translocação de hormônios e destoxificação (Frelet-Barrand *et al.*, 2008, Martinoia *et al.*, 2002), deposição de lipídios para a formação de cutícula (Pighin *et al.*, 2004), participam do transporte de auxina (Noh *et al.*, 2001), regulação do movimento estomático (Lee *et al.*, 2008), e no acúmulo de compostos de defesa em órgãos especializados como rizomas (Shitan *et al.*, 2003) e tricomas (Strckens *et al.*, 2005). Todos esses transportadores tem a habilidade de ligar e hidrolisar ATP como fonte de energia para dirigir o transporte através da membrana. Individualmente, essas proteínas podem funcionar como exportadores, importadores, ou canais ATP regulados. Assim, transportadores ABC desempenham um importante papel no crescimento dos órgãos, nutrição e desenvolvimento da planta, resposta a estresse abiótico, e interação da planta com o meio ambiente (Kang *et al.*, 2011).

Dada a importância do conhecimento das funções desses transportadores, estudos tem sido realizados para analisar a função de alguns genes dessa família, com o auxílio da genética reversa em conjunto a análises de expressão heteróloga. Muitos foram caracterizados como transportadores de auxina (como exemplo *AtABCBI* e *AtABCBI9*) (Verrier *et al.* 2008), como no trabalho desenvolvido na Universidade de Purdue – EUA, onde a estudante de

doutorado Anne Sophie orientada pelo professor Angus Murphy, estudou a caracterização funcional e estrutural de alguns genes *ABCB* em *Arabidopsis* e arroz.

Sophie *et al.* (2012, dados não publicados), encontraram fortes evidências que um dos genes estudados, *OsABCB17*, é um transportador de ácido ferúlico, que está diretamente relacionado a via dos fenilpropanóides. Eles apresentaram, com o auxílio de ferramentas de bioinformática, os possíveis substratos para algumas dessas proteínas *ABCB*. Estudaram os genes *AtABCB4* e *OsABCB17*, que são genes altamente similares porém com apenas algumas diferenças, diferenças essas que poderiam levar a mudança na sua estrutura tridimensional, alterando assim a função. O gene *AtABCB4* já é bem caracterizado como transportador de auxina, porém não são encontrados muitos trabalhos a respeito do gene *OsABCB17*. Os resultados indicaram que realmente essas pequenas mudanças na estrutura dos genes conferem a funções diferentes. Em análises *in silico* foram definidas a maior afinidade dessa proteína *OsABCB17* ao ácido ferúlico. A partir da genética reversa foi possível estudar a expressão heteróloga do gene em *Arabidopsis* e constatar que ele possivelmente não transporta auxina, ao contrário do gene *AtABCB4*. Estudos preliminares utilizando mutantes desse gene, mostraram outra evidência de que ele não transporta auxina, pois como descrito por Xu e colaboradores em 2005, quando analisados mutantes de arroz para o transporte de auxina, esses apresentaram alterações significativas no número de perfilhos, e esse resultado não foi observado nesses mutantes. Outra evidência foi obtida quando esses mutantes foram submetidos a tratamento com uma molécula inibidora do transporte de auxina, tanto o tipo selvagem como os mutantes responderam da mesma forma. E finalmente eles realizaram análises heterólogas com leveduras *S. pombe* transformadas com esse gene, e observaram o possível transporte dos substratos, auxina e ácido ferúlico. Os resultados mostraram a ocorrência de uma toxicidade para as leveduras, possivelmente ocasionada pela capacidade de transportar o ácido ferúlico acrescentado ao meio, comprovando mais uma vez a evidência do envolvimento do gene *OsABCB17* no transporte de ácido ferúlico. A partir disso, com o objetivo de dar continuação à elucidação da possível função desse gene, foram realizados diversos estudos desses mutantes, tais como análises fisiológicas complementares, análises de expressão de alguns genes da rota da lignina, quantificação do teor de lignina, dentre outras análises.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (FA) foi isolado primeiramente em 1866 de *Ferula foetid* (Fazary & Ju, 2007). Derivado da rota dos fenilpropanóis (Ou & Kwok, 2004), é encontrado nas paredes primárias e secundárias de gramíneas, sendo mais abundante na epiderme, vasos do xilema, feixes da bainha e esclerênquima (Faulds & Williamson, 1999; Lambert *et al.*, 1999). Os resíduos de ácido ferúlico são introduzidos principalmente para dentro da parede celular polissacarídea de gramíneas através de uma ligação éster entre o grupo carboxílico do ácido ferúlico e o álcool primário do carbono a C5 da cadeia lateral de arabinose (Hartley & Ford, 1989; Ralph & Helm, 1993), mas pode também ser covalentemente ligado aos monômeros de lignina através de uma ligação éster (Scalbert *et al.*, 1985; Kondo *et al.*, 1990), e pode ser libertado por hidrólise alcalina à temperatura ambiente ou por hidrólise ácida ( Lam *et al.*, 1994).

Estresses por FA tem mostrado seu forte poder aleloquímico com muitos efeitos nas plantas, como a redução da utilização da água, inibição da expansão foliar e alongamento da raiz, redução das taxas de fotossíntese e inibição da absorção de nutrientes (Siqueira *et al.*, 1991; Einhellig 1995). A nível celular, o aleloquímico induz a peroxidação lipídica, afeta certas atividades enzimáticas, e rapidamente despolariza a membrana das células da raiz causando um generalizado aumento na permeabilidade da membrana, bloqueando então a absorção de nutrientes da planta (Weir *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, o ácido ferúlico pode ser esterificado com polissacarídeos da parede celular, incorporados dentro da estrutura da lignina, ou formando pontes que conectam a lignina com polissacarídeos de parede, tornando a parede celular mais rígida e restringindo o crescimento celular (Sánchez *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2001). Muitos trabalhos tem mostrado a ação do ácido ferúlico em plantas. Em soja foram descritas reduções no comprimento das raízes, prematura lignificação e aumento da atividade da primeira enzima envolvida da rota dos fenilpropanóides, a enzima *PAL* (dos Santos *et al.*, 2004), assim como em pepino (Politycka 1998). Porém, alguns resultados são contraditórios, Sato e colaboradores em 1982 apontaram que o tratamento com FA foi ineficiente na atividade de *PAL* em batata doce e pera, e em outro trabalho com pepino (Shann & Blum

1987). Dos Santos e colaboradores em 2008, mostraram novamente que após tratamento com FA as raízes de soja tiveram seu comprimento diminuído e um aumento no teor de lignina, porém nesse trabalho eles analisaram a atividade da enzima *CAD*, que ao contrário da *PAL*, teve sua atividade diminuída após tratamento mesmo obtendo a produção de lignina.

## 2.2 Lignina

A lignina é uma das mais importantes biomoléculas em plantas vasculares, possui o ferulato em sua estrutura, e é envolvida na estrutura de suporte, transporte de água dentre outras funções (Higuchi T, 2006; Boerjan *et al.*, 2003). O aparecimento da lignina durante a evolução foi crucial para a adaptação das plantas ao ambiente terrestre, e sua presença é restrita às plantas vasculares (pteridófitas, gimnospermas e angiospermas), entretanto, foi encontrado em briófitas e algas vermelhas um material polifenólico, que não é propriamente a lignina, mas que possui funções similares a ela (Gomes *et al.*, 2007; Martone *et al.*, 2009). A lignina é considerada uma molécula altamente hidrofóbica, possuindo um papel essencial no transporte de água e como o principal componente dos tecidos vasculares (Coleman, *et al.*, 2008; Boyce *et al.*, 2004), sendo preferencialmente depositadas nas paredes celulares de tecidos envolvidos no suporte mecânico ou na condução de água, principalmente no xilema, mas também no esclerênquima, fibras do floema e periderme (Baucher *et al.*, 1998). Adicionalmente, a lignina está envolvida em uma variedade de funções biológicas incluindo defesa da planta e resistência a estresse abiótico (Quentin *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2008).

Do latim *lignum* significa madeira, é um polímero de fenilpropanóides, altamente ramificado. Depois da celulose, é a substância orgânica mais abundante nas plantas e representa aproximadamente 30% do carbono orgânico encontrado na biosfera (Boerjan *et al.*, 2003).

### 2.3 Biossíntese da lignina

São necessários dois passos principais para a biossíntese da lignina, primeiro são biossintetizados os monolignóis e posteriormente esses são ligados para formar os polímeros de lignina que serão conectados a hemicelulose e celulose. O início da biossíntese dos monolignóis ocorre com a desaminação da fenilalanina para formar o ácido cinâmico e sucessivas hidroxilações e metilações resultam na produção dos três mais abundantes monômeros de lignina, ou monolignóis: álcool *p*-cumaril (4-hidroxicinamil), álcool coniferil (3-metoxi 4-hidroxicinamil) e álcool sinapil (3,5-dimetoxi-4 hidroxicinamil) (Boerjan *et al.*, 2003; Bonawitz & Chapple, 2010). Quando estes monolignóis são incorporados na lignina, eles são chamados de unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Raes *et al.*, 2003). A quantidade e a composição da lignina variam em relação as taxas dos monolignóis, tipo celular, camadas de células individuais que são influenciadas pelo desenvolvimento celular e mudanças ambientais (Campbell & Sederoff, 1996). Apesar de existir exceções, as angiospermas dicotiledôneas consistem em principalmente unidades de G e S e traços de H, ao passo que gimnospermas possuem a sua lignina composta basicamente de unidades G e pouca quantidade de lignina H. Lignina de gramíneas incorporam G e S em níveis iguais, e mais unidades da lignina H quando são dicotiledôneas (Baucher *et al.*, 1998). Durante a maturação do colmo de algumas gramíneas a lignina siringil (S) aumenta em proporção com relação à guaiacil (G) e *p*-hidroxifenil (H) (Carpita, 1996).

Nessa biossíntese dos monolignóis, vários genes estão envolvidos, e essa complexidade é atribuída a várias enzimas multifuncionais, que também correspondem a diferentes famílias de genes (Xu *et al.*, 2009). Essa via bioquímica é altamente conservada em plantas vasculares, e a maioria das enzimas já foram identificadas e caracterizadas (Humphreys & Chapple, 2002). O processo é iniciado com desaminação do amino ácido fenilalanina a ácido trans-cinâmico, via ação da fenilalanina amonialiase (*PAL*). O ácido trans-cinâmico é então convertido em ácido cumárico pela ação de um citocromo monooxigenase P450, o cinamato-4 Hidroxilase (*C4H*). A partir de então, os ácidos hidroxicinâmicos originados são convertidos em ésteres de CoA por meio da hidroxicinamoil CoA ligase (*4CL*). Estes ésteres são convertidos até monolignóis em duas etapas sucessivas de redução, a primeira é catalisada por hidroxicinamoil-CoA redutase (*CCR*) formando os cinamaldeídos, e a segunda etapa via ação da cinamil álcool desidrogenase (*CAD*) formando

os hidroxicinamoil álcoois também denominados monolignóis (Hano *et al.*, 2006). Foi descoberta, também, a existência de uma sinapil álcool desidrogenase (*SAD*) que agiria nesta última etapa de conversão dos cinamaldeídos à cinamil álcoois, reduzindo preferencialmente sinapaldeído a sinapil álcool (Li *et al.*, 2001). Na etapa final da rota, as peroxidases e lacases catalisam a polimerização dos monolignóis que levam à síntese de lignina. Desta forma, pode ser considerado que a lignina é um heteropolímero de unidades de fenilpropano com diferentes graus de hidroxilações e metilação, derivado da polimerização oxidativa de diferentes álcoois hidroxicinamil (*p*-cumaril, coniferil e sinapil) (Boerjan *et al.*, 2003; Bonawitz & Chapple, 2010). Essas são as enzimas chaves no processo, porém a partir das análises de plantas mutantes, transgênicas, e o estudo de sistemas heterólogos, outras enzimas foram adicionadas a rota da biossíntese de lignina como pode ser observada na figura 1.

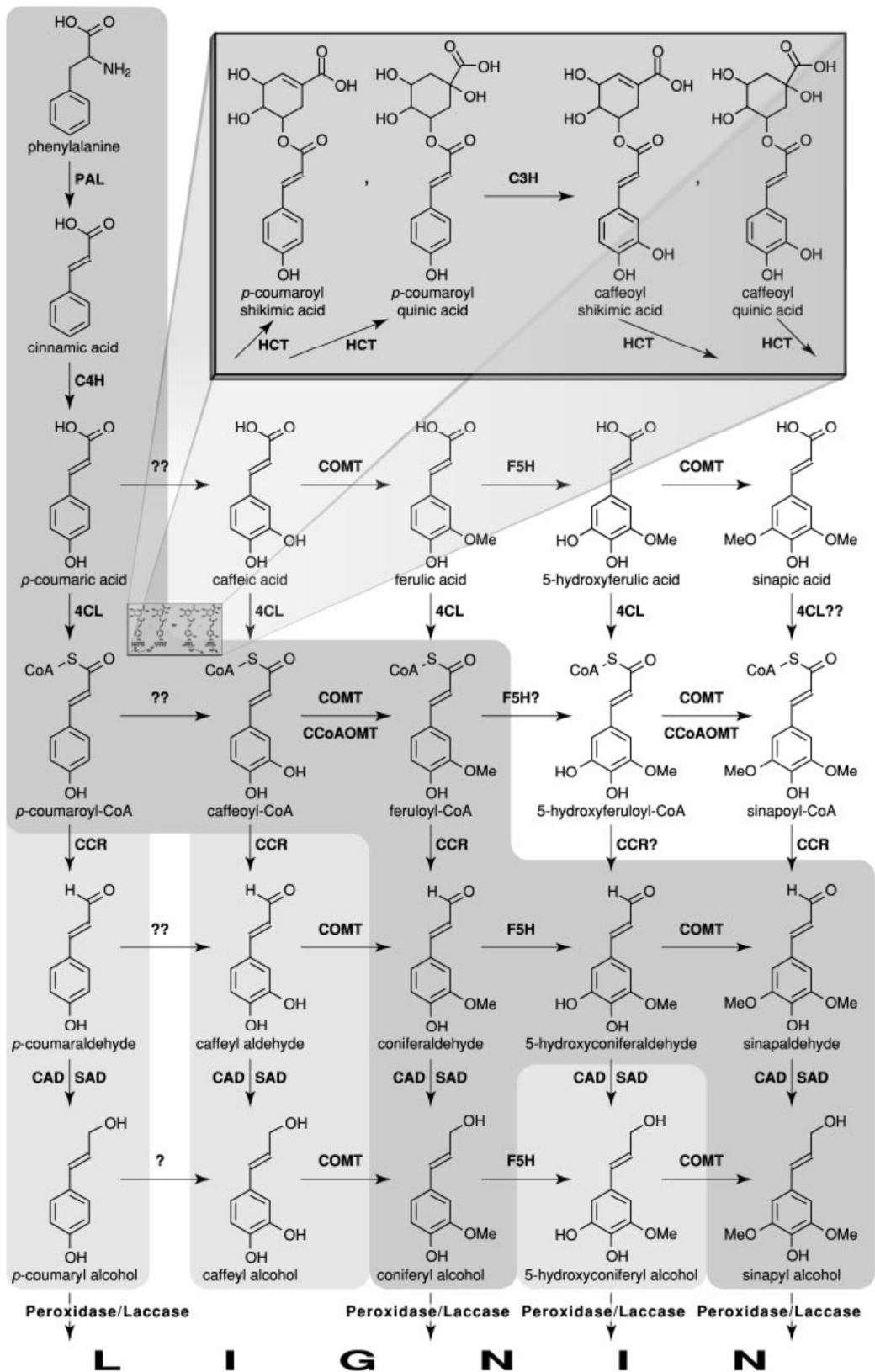


Figura 1 - Rota da síntese dos fenilpropanóides, mostrando as possibilidades de conversões realizadas por todas possíveis enzimas (Boerjan *et al.*, 2003).

A *PAL* é a primeira enzima geral da via de fenilpropanóis que catalisa a desaminação monoxidativa da fenilalanina a ácido trans-cinâmico e NH<sub>3</sub>. *PAL* é responsável pelo influxo do metabolismo primário para a via de fenilpropanóis (Sewalt *et al.*, 1997). Análises filogenéticas dos genes de *PAL* em várias espécies evidenciaram diferentes classes de família do gene *PAL* (Raes *et al.*, 2003).

A enzima *4CL* converte o ácido cumárico em outros substitutos do ácido cinâmico, como ácido cafeico, ferúlico e cinâmico. Os genes *4CL* tem sido clonados em numerosas espécies de plantas onde eles existem em uma pequena família gênica, variando de dois e cinco membros (Ehlting *et al.*, 1999; Gui e Shen, 2011; Hahlbrock, 2004; Lindermayr, 2002; Silber, 2008; Ehlting, 1996; Hu, *et al.* 1998; Zhao, 2006; Heath, 2002). Em algumas espécies estão sendo estudadas as propriedades catalíticas dessas isoformas. Em batata, salsa e o pinheiro (*Loblolly pine*), foram identificadas proteínas que possuem similar afinidade ao substrato (Ehlting, 1996; Lozoya *et al.*, 1988; Harding *et al.*, 2002), e em outras plantas, como em *Aspen* e *Arabidopsis*, a família *4CL* continha membros estruturalmente e funcionalmente distintos (Ehlting *et al.*, 1999; Hahlbrock, 2004; Hu *et al.*, 1998). Essas isoformas controlam a abundância relativa de flavonóides e vários monolignóis durante um desenvolvimento normal (Knobloch & Hahlbrock, 1977). A expressão do gene é também induzida pelo estresse, como no ferimento, ataque de patógenos e irradiação UV, contra os quais os compostos fenilpropanóides podem ter o papel de proteção (Kubasek *et al.*, 1992). Então, diferentes isoformas de *4CL* tem diversas funções no desenvolvimento e resposta a estresse. Em arroz, cinco genes codificam a enzima *4CLs* (Gui & Shen, 2011), entretanto pouco se conhece sobre a natureza das isoformas no direcionamento do fluxo metabólico para a biossíntese de diferentes classes de fenólicos com especializadas funções. Em 2013, Sun e colaboradores indicaram algumas diferenças funcionais dessas 5 isoformas, mostrando que uma forma (*Os4CL2*) está associada com a biossíntese de flavonóides, enquanto as outras, *Os4CL1/3/4/5*, estão envolvidas na via dos ácidos hidroxicinâmicos derivando para a síntese de lignina.

A *COMT* (ácido cafeico 3-O-metiltransferase) catalisa múltiplas reações de metilação de monômeros hidroxilados dos precursores da lignina. Acredita-se que duas metiltransferases distintas são responsáveis pela metilação dos precursores da lignina. A *COMT* que metila o ácido cafeico e o ácido hidroxiferúlico (Zubieta *et al.*, 2002), e a *CCoMT* (caffeoil CoA 3-O-methyltransferase) que metila caffeoil-CoA e 5-hydroxyferuloyl-CoA (Ferrer *et al.*, 2005). Em angiospermas dicotiledôneas, ambos *COMT* e *CCoMT* são bi-específicos. Em contraste, acredita-se que o *COMT* em gimnospermas catalisa o ácido cafeico e não o ácido

hidroxiferúlico. Entretanto, o substrato específico das *OMT* em angiospermas monocotiledôneas são muito menos explorado. Os pesquisadores sugerem que *COMT* e não *CCoMT* são essenciais para a biossíntese da lignina S, enquanto ambos estão envolvidos na biossíntese da G. Em tabaco, a repressão do gene *COMT* somente diminuiu a unidade S sem reduzir no conteúdo de lignina total, e a repressão de *CCoMT* resultou na drástica redução do conteúdo de lignina assim como a redução das unidade S e G (Ye *et al.*, 2001). Em milho, a repressão de *COMT* resultou na forte diminuição no conteúdo de lignina, a redução da unidade S, mas um aumento da G (Piquemal *et al.*, 2002). Esses contraditórios resultados são possíveis devido a diferente inespecificidade em tipos de tecidos e a maturidade (Dellaporta *et al.*, 1983), mas a diferenças na biossíntese de lignina e preferências de substrato em diferentes plantas não podem ser omitidos. Como detalhes de análises bioquímicas da proteína COMT em monocotiledôneas, Ma e Xu em 2009, combinaram seus resultados com alguns dados sobre tabaco, alface e milho e indicaram que *COMT* é principalmente envolvida na síntese da lignina S.

O gene *CAD* codifica uma enzima chave no processo de formação dos monolignóis, atuando nos processos finais dessa via. Análises filogenéticas realizadas por Guo e colaboradores em 2010, sugeriram que o surgimento da verdadeira lignina nas plantas vasculares está diretamente relacionada com a origem dos genes *CAD*. Em *Arabidopsis* já foram descritos nove membros (Sibout *et al.* 2003; Costa *et al.*, 2003; Goujon *et al.*, 2003; Raes *et al.*, 2003). E em arroz 12 genes foram descritos, localizados em nove diferentes locus que codificam produtos com alta similaridade a *CAD* (Halpin *et al.*, 1998), porém somente o gene *OsCAD2* foi identificado como um verdadeiro gene *CAD*, mostrando uma alta expressão em relação aos outros genes da família (Zhang *et al.*, 2006; Hirano *et al.*, 2012). Mas praticamente não foi encontrada redução no teor de lignina quando analisados os mutantes nulos para *OsCAD2* (*gh2*), sugerindo que os outros genes *CAD* trabalham em cooperação com o *OsCAD2* na biossíntese dos monolignóis em arroz ou que existe outro tipo de lignina que é produzida independente de *CAD* (Hirano *et al.*, 2012). Outro gene que possivelmente atua na biossíntese da lignina, é o *OsCAD7*, que ocasionou reduzidos teores de celulose e lignina com a sua falta (Li *et al.*, 2009).

O metabolismo dos fenilpropanóides é regulado primariamente via controle transcricional desses correspondentes genes. A acumulação de mRNAs e a atividade de seus promotores variam durante a diferenciação celular, quando certas células se tornam especializadas para a biossíntese de compostos derivados de fenilpropanóides, como lignina,

flavonóides e antocianinas. O estudo dos mutantes de cada gene dessa rota é de extrema importância para definir claramente quais os genes, como eles são regulados, e como realmente eles atuam nesse processo.

A fim de serem incorporados ao polímero de lignina, os monolignóis devem primeiro ser transportados via apoplasto em um processo pouco conhecido (Kaneda *et al.*, 2008; Samuels *et al.*, 2002). Foi hipotetizado que os monolignóis são estocados e transportados para o apoplasto como glicosídeos e então liberados para polimerização pela ação das glucosidases. Porém, muitos trabalhos estão realizados no intuito de se entender mais sobre esse processo. Em 2008, Kaneda e colaboradores descreveram outro processo, mostrando que a fenilalanina marcada pode ser incorporada em ambas as células da parede secundária e dentro das vesículas do complexo de Golgi. Entretanto, tratamentos com inibidores das proteínas de síntese foram suficientes para eliminar completamente a marcação no complexo de Golgi, mas não na parede secundária, uma forte evidência de que a marcação no Golgi é atribuída a síntese de proteínas, não ao transporte de monolignóis. Alguns transportadores da família ABC tem sido propostos como uma alternativa para o transporte vesicular, mas ainda é distante a evidência para suportar essa hipótese (Nicholas & Chapple, 2010). Esses monolignóis são sintetizados no citosol e terminam em várias localizações subcelulares, a parede celular, vacúolo ou complexo de Golgi.

## 2.4 Família dos genes ABC

A superfamília dos transportadores ABC é uma das maiores famílias de transportadores em plantas (Rea, 2007; Verrier *et al.*, 2008). Mais de 120 genes têm sido anotados no genoma de *Arabidopsis* baseados na similaridade específica dos motivos e dos múltiplos domínios transmembrana (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001; Verrier *et al.*, 2008). Similares números de genes transportadores ABC também foram encontrados em *Oryza sativa* (Garcia *et al.*, 2004; Jasinski *et al.*, 2003).

Todos os transportadores ABC são membros de uma família de proteínas que possuem a habilidade de se ligar e hidrolisar ATP como fonte de energia para dirigir o transporte através da membrana plasmática, podendo funcionar como exportadores, importadores ou canais ATP regulados. Eles são essenciais em todos os filos, estão envolvidos em processos

de destoxificação em procariotos e na absorção de nutrientes e hormônios (Nikaido, 1998; Wolfger Mamnun, & Kuchler, 2001; Singh *et al.*, 2008). Em animais algumas das suas funções incluem a manutenção do sangue cerebral, placentário e intestinal (Hagenbuch *et al.*, 2002, Deeken *et al.*, 2007) e transporte de esteróides (Kimura *et al.*, 2007). Em plantas, os transportadores ABC funcionam na acumulação de metabólitos secundários (Shitan *et al.*, 2003), translocação hormonal (Frelet-Barrand *et al.*, 2008, Martinoia *et al.*,) deposição de lipídios que formam a cutícula (Pighin *et al.*, 2004; Panikashvili *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2007), transporte auxina (Noh *et al.*, 2001), movimentos estomáticos (Lee *et al.*, 2008) e acumulação de compostos de defesa em órgãos especializados como os rizomas (Shitan *et al.*, 2003) e tricoma glandular (Stukkens *et al.*, 2005).

Verrier e colaboradores (2008), distinguiram nove subfamílias desses transportadores ABC, ABCA-ABCI. As subfamílias mais bem caracterizadas são ABCB, ABCC e ABCG. A subfamília ABCB possui sequências que codificam proteínas da membrana plasmática conhecidas como MDR/PGP (glicoproteínas resistentes a multi-drogas) e proteínas localizadas em membranas intracelulares, mitocôndria e tonoplasto, TAPs/HMTs (transportadores associados a antígenos ou fatores de tolerância a metal pesado). Esses transportadores de membrana ABC possuem importante papel no crescimento e desenvolvimento de plantas. Como exemplo, os genes *AtABCB1* e *AtABCB19*, translocam um essencial hormônio de crescimento, a auxina, e sua deleção leva a um fenótipo de nanismo em *Arabidopsis thaliana*. Similar fenótipo também é observado em mutantes de milho (*br2*), ortólogos ao gene *AtABCB1* (Multani *et al.*, 2003).

A subfamília B é uma subfamília grande e diversa, que possui membros definidos pela organização dos domínios e homologia (Sánchez- Fernández *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004). Classificados como MDR/PGP, são associados a resistência à multi drogas e transporte de lipídios em humanos e existem evidências de terem sofrido apreciável diversidade funcional em plantas, conseqüentemente assumindo papel no transporte de auxina, metabólitos secundários e xenobióticos (Geisler & Murphy, 2006; Shitan *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2007). Múltiplos membros dessa subfamília estão envolvidos no transporte de auxina (Geisler & Murphy, 2006), que é um dos mais importantes hormônios na diferenciação e resposta aos sinais ambientais em plantas. Vários são os exemplos de genes dessa subfamília, como os genes *AtABCB1* e *AtABCB19* descritos acima, *AtABCB25* envolvido no transporte de ferro e enxofre e quando superexpresso em *Arabidopsis*, conferiu tolerância a cádmio e chumbo

(Kim *et al.*, 2006), o gene *AtABCB27* descrito como envolvido na resistência ao alumínio (Larsen *et al.*, 2007), dentre outros vários genes caracterizados.

Após analisar o nível de expressão dos genes ABC em inflorescência de *Arabidopsis*, Ehrling e colaboradores em 2005, notaram que existia alguma correlação desses genes com a biossíntese de fenilpropanóides, e então, identificaram quatro desses genes. Em 2011, Kanida e colaboradores apresentaram essa correlação em 14 genes que foram diferencialmente expressos na haste da inflorescência. Além disso, em oito deles foi encontrado um tipo de cis-elemento que está presente nos genes que codificam as enzimas da via dos fenilpropanóides, e em quatro desses, foram encontrados três cis-elementos. Desta forma, se esses genes contêm esses cis-elementos conservados, provavelmente esse é mais um indício de que alguns transportadores ABC podem estar envolvidos na via dos fenilpropanóides. Através desse e de vários outros trabalhos, o envolvimento desses genes ABC no transporte de algum componente dessa via é plausível, porém ainda é uma hipótese não comprovada (Kaneda *et al.*, 2011).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

Foram utilizados dois mutantes de arroz (*Oryza sativa*, Japonica var. Nipponbare) para o gene *OsABC17*, provindos de trabalhos posteriores realizados na Universidade de Purdue/EUA pela estudante Anne Sophie sob orientação do Prof. Angus Murphy. Esses mutantes foram obtidos por meio do transposon *TOS17*, o qual foram identificadas duas linhas independentes (NF7776 e NF8528). Essas sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (10 %) por aproximadamente 10 min e germinadas em câmaras de crescimento ( $27 \pm 2$  °C) com fotoperíodo de 12 h por 15 dias. Foram transferidas para hidroponia com solução de Hoagland (pH 6,0) em casa de vegetação, renovando a solução a cada sete dias. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura ambiente de  $30 \pm 5$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 20$  %. Os tecidos vegetais utilizados foram folhas e bainha considerados tecidos jovens, de menos de 7 cm de comprimento, considerados tecidos dreno, folhas e bainha com mais de 7 cm considerados fonte e raiz.

Após dois meses, algumas plantas foram submetidas a concentrações de 1,0 mM de ácido ferúlico e 0,1 mM de ácido piperonílico (PIP), acrescentadas a solução de Hoagland. Os resultados foram avaliados após 15 dias.

Para o segundo experimento, em aproximadamente quatro meses de cultivos, outras plantas foram submetidas à seca com PEG6000. A seca foi induzida através de um estresse de - 1 MPa, porém com um aumento gradativo (- 0.5 Mpa e - 1,0 Mpa). Após uma semana as plantas foram submetidas à reidratação e analisados os resultados.

O delineamento experimental utilizado para o experimento do FA/PIP, foi inteiramente casualizados (DIC), num arranjo fatorial 3x3x5, com o primeiro fator correspondendo aos genótipos, o segundo aos tratamentos, e o terceiro aos tipos de tecidos vegetais, com três repetições e uma planta por parcela. Para as análises fisiológicas do experimento de seca foi realizado um arranjo fatorial de 3x2, com quatro repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA), sendo posteriormente aplicado um teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software Sisvar.

## 3.2 Caracterização fisiológica

### 3.2.1 Determinação das trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas utilizando um analisador de gás por infravermelho – IRGA (modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Foram utilizadas folhas completamente expandidas para a medição da taxa de assimilação fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa de transpiração ( $E$ ), temperatura da folha ( $T_{leaf}$ ) e a concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ). As medições foram realizadas no período da manhã, em casa de vegetação, utilizando constantes concentração atmosférica de  $CO_2$  ( $C_a$ ) ( $\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), temperatura (24-28 °C), umidade (55-66 %) e intensidade de luz ( $\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### 3.2.2 Teor relativo de água

Para determinação do teor relativo de água foram retirados discos foliares (5 mm de diâmetro) de cada planta, determinando imediatamente a massa dos mesmos. Os discos pesados foram transferidos para placas de Petri e permaneceram a temperatura ambiente submersos em água destilada por um período de 4 h. Após esse período, os discos foram dispostos em papel de filtro para retirar o excesso de água e em seguida pesados novamente para determinar a massa túrgida. Em seguida, os discos foram levados a estufa a 70 °C até massa constante e posteriormente determinada à massa seca dos discos. Os resultados foram expressos em porcentagem, conforme fórmula de Slavick (1979) descrita abaixo:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{\text{MF1} - \text{MS}}{\text{MF2} - \text{MS}} \times 100$$

TRA: Teor relativo de água

MF1: matéria fresca

MF2: matéria turgida, após 4h de saturação em água destilada;

MS: matéria seca, determinada após aproximadamente 24h em estufa.

### **3.2.3 Altura da parte aérea e radicular**

A altura da planta foi determinada, medindo-se a distância entre o colo da planta até a extremidade superior da folha mais alta, assim como a parte radicular, realizada por meio da medição com régua. Foram realizadas duas medições, uma a aproximadamente 60 dias de crescimento das plantas e a outras a aproximadamente 120 dias.

### **3.2.4 Número de perfilhos e panículas por planta**

Foi realizada mediante contagem nas plantas WT e mutantes, com aproximadamente 120 dias de crescimento.

### **3.2.5 Análise das raízes**

As raízes foram coletadas e armazenadas em tubos falcon contendo álcool 25 % e mantidas a temperatura ambiente até a realização das análises. As avaliações foram realizadas em um scanner (Epson Scanner), desenvolvido para esse fim, acoplado a um microcomputador dotado do programa WinRhizo, que utiliza como princípio o método proposto por Tennant (1975). Esse scanner continha uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento contendo água, onde as raízes foram dispostas. A utilização deste acessório permitiu a obtenção de imagens em três dimensões, evitando a sobreposição das

raízes, caracterizando um método muito preciso. Foram determinados o comprimento, diâmetro, volume e área superficial, além de classificar as raízes em relação ao diâmetro.

### **3.2.6 Densidade estomática**

A determinação da densidade de estômatos foi obtida pelas superfícies adaxial e abaxial das folhas, utilizando-se impressões da superfície da folha. Foi utilizada a técnica de impressão de epiderme em adesivo a base de éster de cianoacrilato (Mendonça, 2000). Para isso, uma gota da cola foi depositada em lâminas de vidro para microscopia, as folhas foram colocadas com a superfície voltada para a cola e foi então pressionada na lâmina por alguns minutos, após seco o material foi retirado permanecendo a impressão da epiderme na lâmina. As lâminas foram fotodocumentadas em microscópio ótico de luz, a um aumento de 20X, acoplado ao computador com o software Axiovision, e analisadas as imagens no programa ANATI QUANT2 da UFV.

### **3.2.7 Massa seca**

As plantas (parte aérea e raiz) foram acondicionadas em sacos de papel e posteriormente colocados em estufa com circulação forçada de ar, a 70 °C até peso constante. Posteriormente foi determinada a matéria seca pesando as amostras em balança eletrônica.

## **3.3 Determinação do teor de lignina**

A determinação do teor de lignina foi realizada segundo o protocolo de Foster *et al.* (2010), em que primeiramente foi realizada a extração e isolamento das células da parede celular e posteriormente realizada a quantificação da lignina utilizando brometo de acetil. O material de folha e bainha, dreno e fonte, e raiz foram coletados e o material fresco foi seco

em estufa a 75 °C, até atingir o peso constante. Posteriormente foram moídos em moinho tipo Wiley e peneirados para obter granulometria constante em todas as amostras. O material foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado para posterior realização das análises.

Para o primeiro passo de remoção dos extrativos e isolamento das células da parede celular, foram utilizadas aproximadamente 30 mg do tecido vegetal moído anteriormente, onde foram acrescentado 750 µL de etanol 70 %, centrifugado e desprezado o sobrenadante para que todos os resíduos solúveis em álcool sejam eliminados. Novamente foi realizada a lavagem e centrifugação, porém com clorofórmio/metanol (1:1), e o pellet ressuspendido em 250 µL de acetona. Esse solvente foi evaporado com a ajuda do *speed vacuum* por aproximadamente 20 min. Para iniciar o isolamento das células da parede celular, os materiais livres de extrativos foram ressuspendidos em 750 µL de acetato de sódio (0,1 M), aquecidos por 20 min a 80 °C, e resfriadas em gelo. Posteriormente foram adicionadas enzimas  $\alpha$ -amilase, pululanase em 0,01 % azida de sódio (35, 17 e 35 µL respectivamente), incubados a 37 °C, *overnight* em constante agitação. Após esse período, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min para finalizar a digestão. As amostras foram centrifugadas e o pellet lavado três vezes com água tipo miliQ. O pellet foi ressuspendido em 250 µL de acetona e novamente evaporado o solvente. Após seco, o material foi acondicionado em local hermeticamente fechado para posterior quantificação de lignina.

Para a determinação do teor de lignina total, foram usados 1,5 mg do material livre de extrativos. Novamente foi acrescentado acetona ao material, para certificar que todo o material permaneça no fundo do tubo. Após evaporada toda acetona, foi preparada uma solução com acetato de brometo e ácido acético glacial e acrescentado 100 µL em cada amostra, essas foram aquecidas por 3 h a 50 °C, com agitações frequentes na última hora de aquecimento, e a seguir colocadas em gelo para alcançar a temperatura ambiente. Posteriormente foram acrescentados 400 µL de hidróxido de sódio (2 M) e 70 µL de hidrocloreto de hidroxilamina (0,5 M), completado o volume do ependorf de 2 mL com ácido acético glacial e foram feitas as leituras de absorbância a 280 nm. Para a determinação da porcentagem de lignina, foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Absorção a 280 nm}}{(\text{Coeficiente} \times 0,539 \text{ cm})} \times \frac{(2 \text{ mL} \times 100 \%)}{\text{Peso da massa seca (mg)}}$$

Onde o coeficiente para gramíneas é 17,75 e o número 0,539 cm corresponde a dimensão da placa usada para leitura.

### **3.4 Caracterização anatômica – análise histoquímica**

Para a análise histoquímica, foram coletadas folhas e bainha das plantas de arroz submetidas ao experimento de FA/PIP, com quatro repetições, fixados em FAA<sub>50</sub> por 48 h (Johansen, 1940) e estocados em etanol 70 %. O material foi cortado utilizando criomicrotomo. Para coloração, na determinação do padrão de deposição de putativos grupos aldeído coniferil e grupos da lignina do tipo G, foi utilizada a reação de Wiesner (floroglucina ácida) (Patten *et al.*, 2005). As imagens digitalizadas foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, *Olympus Optical*) com sistema *U-Photo*, acoplado a câmera fotográfica digital (modelo *Spot Insightcolour 3.2.0*, *Diagnostic Instruments Inc.*) e microcomputador com o programa de captura de imagens *Spot Basic*.

### **3.5 Extração RNA, síntese de cDNA e Real Time PCR**

Foram extraídos tecidos vegetais (folhas, bainha e raiz), considerados em processo recente de desenvolvimento (tecidos dreno). O protocolo utilizado foi Trizol com algumas modificações. O reagente Trizol foi preparado utilizando 38 % de fenol ácido pH 4,5, 0,8 M de tioceanato de guanidina; 0,4 M tioceanato de amônio; 0,1 M acetato de sódio pH 5,0; 5 % de glicerol e água livre de RNases tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). Ao tecido macerado foi acrescentado 1 mL do tampão de extração, o sobrenadante foi centrifugado com cloreto de sódio 5 N e clorofórmio P.A. para a separação das fases. A fase aquosa contendo o RNA foi separada e precipitada com igual volume de isopropanol P.A. Em seguida, as amostras foram lavadas com álcool 75 % por duas vezes. Após ressuscitado em água miliQ DEPC, o material foi quantificado e tratado com DNase (DNaseI – Fermentas) seguindo protocolo do fabricante.

### 3.5.1 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total dos tecidos de arroz (folhas, bainha e raiz) utilizando o Kit Improm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System Promega, seguindo o protocolo do fabricante. Padronizando 1 µg de RNA, foram feitas as sínteses de cDNA de todos os tecidos seguindo protocolo do fabricante. A reação de transcriptase reversa, para um volume final de 20 µL, foi realizada em termociclador e as amostras foram conservadas no freezer a - 20 °C até o uso.

### 3.5.2 Desenho dos *primers*

Alguns *primers* foram obtidos a partir de sequências da literatura obtidas de trabalhos que utilizaram esses genes da rota da lignina em arroz (Sun *et al.*, 2012; Hirano *et al.*, 2012). O gene *OsABCB17* foi utilizado segundo Anne 2009 (dados não publicados). Os genes *COMT* e *PAL* foram desenhados utilizando sequências encontradas no banco de dados *rap-db* (The Rice Annotation Project Database), com o auxílio do programa PRIMER 3. Os endógenos usados foram selecionados pelo programa GeNorm (versão 3.5), dentro dos genes endógenos de arroz descritos em Jain *et al.* (2006).

Tabela 1 - Sequências dos *primers* analisados e seus respectivos acessos

Primer	Sequência 5'- 3'	Acesso
<i>18S</i> F	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	AK059783
<i>18S</i> R	ACACTTCACCGGACCATTCAA	
<i>UBC</i> F	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA	AK059694
<i>UBC</i> R	AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG	
<i>OsABC17</i> F	AGGCGATATCGAGTTCCAGCATGT	Anne, 2009
<i>OsABC17</i> R	ATGGCCTGCATCCGGATCATAGAA	
<i>Os4CL3</i> F	TCCGGACAGAAGGCTCAGAAATCA	Sun <i>et al.</i> , 2012
<i>Os4CL3</i> R	GGATGGAATCGGTGAAGAACACCT	
<i>OsCOMT</i> F	GCCACCTACATCTACGCCAA	Os08t0157500-01
<i>OsCOMT</i> R	ACGACATGATTACCCACGCT	
<i>OsPAL</i> F	AGCTCACTACCTTCTCCTCCG	Os02t0626100-01
<i>OsPAL</i> R	TGAGCGGGTCCTCCTTGTTG	
<i>OsCAD2</i> F	CTGAGCTTCATCTCGCCCAT	AK105011
<i>OsCAD2</i> R	TTGACGACCTCGATCTGGGA	

### 3.5.3 Análise quantitativa da expressão dos genes

A análise da expressão gênica quantitativa foi realizada através do StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, pelo sistema de detecção SYBR Green I. Os cDNAs sintetizados após a extração do RNA foram utilizados como *template* para a análise.

Primeiramente foi realizado um ensaio de quantificação absoluta, onde foi determinada a curva padrão, a eficiência dos *primers* e a melhor diluição para as amostras testadas. Foram realizadas sete diluições seriadas de 5 X (1:1, 1:5, 1:25 ...). Posteriormente, foi realizado um ensaio para determinar a melhor concentração de primers utilizados para uma melhor eficiência da reação. Após determinar 1:25 a melhor diluição das amostras, baseadas e a eficiência dos *primers* de 90 % a 99 % com a concentração de 0,1 µM, foi realizado o ensaio de quantificação relativa, utilizado dois genes endógenos para a normalização (genes *18S* e *UBC* (Ubiquitin C)).

Para cada reação, foram utilizados 0,4 µL de cDNA a uma diluição de 1:25, 1 µL de cada *primer* (2,5 µM), 0,1 dNTP (10 mM), 2 µL do tampão 10X, 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL SYBR Green I (diluído 1:0000), 0,4 µL de ROX, 0,05 µL *Taq Platinum* e água estéril (todos os reagentes da Invitrogen). As condições térmicas da reação foram 10 min a 94 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 15 seg a 60 °C e 20 seg a 70 °C, e finalizando com a curva de melting. Os dados foram coletados, armazenados e analisados no programa StepOne Software (Versão 2.3).

As amostras foram processadas em triplicatas e realizadas três repetições biológicas. Os resultados foram normalizados usando C<sub>Ts</sub> (Ciclo *Threshold*) obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação. O C<sub>T</sub> foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *Threshold*, que foi determinada automaticamente pelo programa. O método usado foi o C<sub>T</sub> comparativo. Para o cálculo da expressão, primeiramente cada amostra foi normalizada com os controles endógenos, utilizando a equação  $\Delta C_T = C_T (\text{gene alvo}) - C_T (\text{controles endógenos})$  e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Todas as análises foram feitas pelo programa StepOne Software (Versão 2.3).

### 3.6 Análise estatística

Para todos os experimentos, foi realizada análise de variância seguido do teste *Scott-Knott* a 5 % de probabilidade, pelo programa SISVAR (Versão 5.3). Para as análises de expressão genica, foi utilizado o programa StepOne Software (versão 2.3).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos mutantes

#### 4.1.1 Alterações no gene *ABCB17* promovem o crescimento aéreo e radicular em plantas de arroz

A primeira análise realizada foi a avaliação do comprimento das plantas de arroz, onde foi observado um aumento tanto da parte aérea quanto da radicular dos mutantes em relação ao tipo selvagem. Foram realizadas duas medições, aos 60 e aos 120 dias de cultivo em hidroponia. Ao analisarmos o crescimento após 60 dias de cultivo, podemos observar maior crescimento da parte aérea somente do mutante 8528 em relação ao tipo selvagem e mutante 7776. Porém aos 120 dias de cultivo, ambos mutantes apresentam maior crescimento da parte aérea, quando comparados com as plantas controle (WT). Em relação a raiz, podemos observar maior crescimento nos dois mutantes em relação ao selvagem aos 60 dias, porém após mais dois meses de crescimento, somente o mutante 8528 se destacou com maior crescimento radicular (Fig.2). Em uma análise mais precisa em relação a raiz das plantas, foram avaliadas o comprimento total de todas as raízes de cada planta após 120 dias, valores médios do diâmetro, volume e área superficial, e em todos os parâmetros os mutantes apresentaram maiores valores do que o controle (tipo selvagem, Fig. 3A). Ao separar as raízes segundo o diâmetro, foi observado que em raízes muito finas, menores que 0,5 mm, os mutantes diferiram significativamente do tipo selvagem, assim como entre raízes que apresentaram o diâmetro entre 0,5 a 2,0 mm. Porém quando se observa as raízes mais grossas das plantas (> 2,0 mm), podemos afirmar que as plantas mutantes 8528 apresentaram significativamente mais raízes grossas que o tipo selvagem e mutante 7776 (Fig 3B).

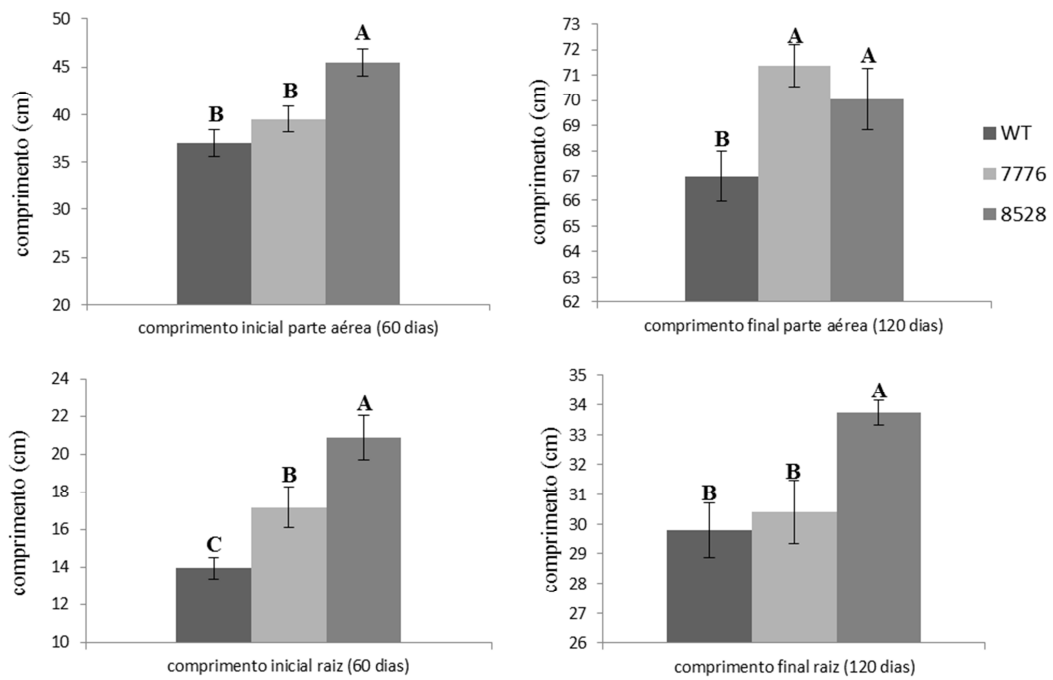


Figura 2 – Diferença na altura da parte aérea e comprimento da raiz após aproximadamente 60 e 120 dias de cultivo de plantas de arroz tipo selvagem e mutantes em hidroponia. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

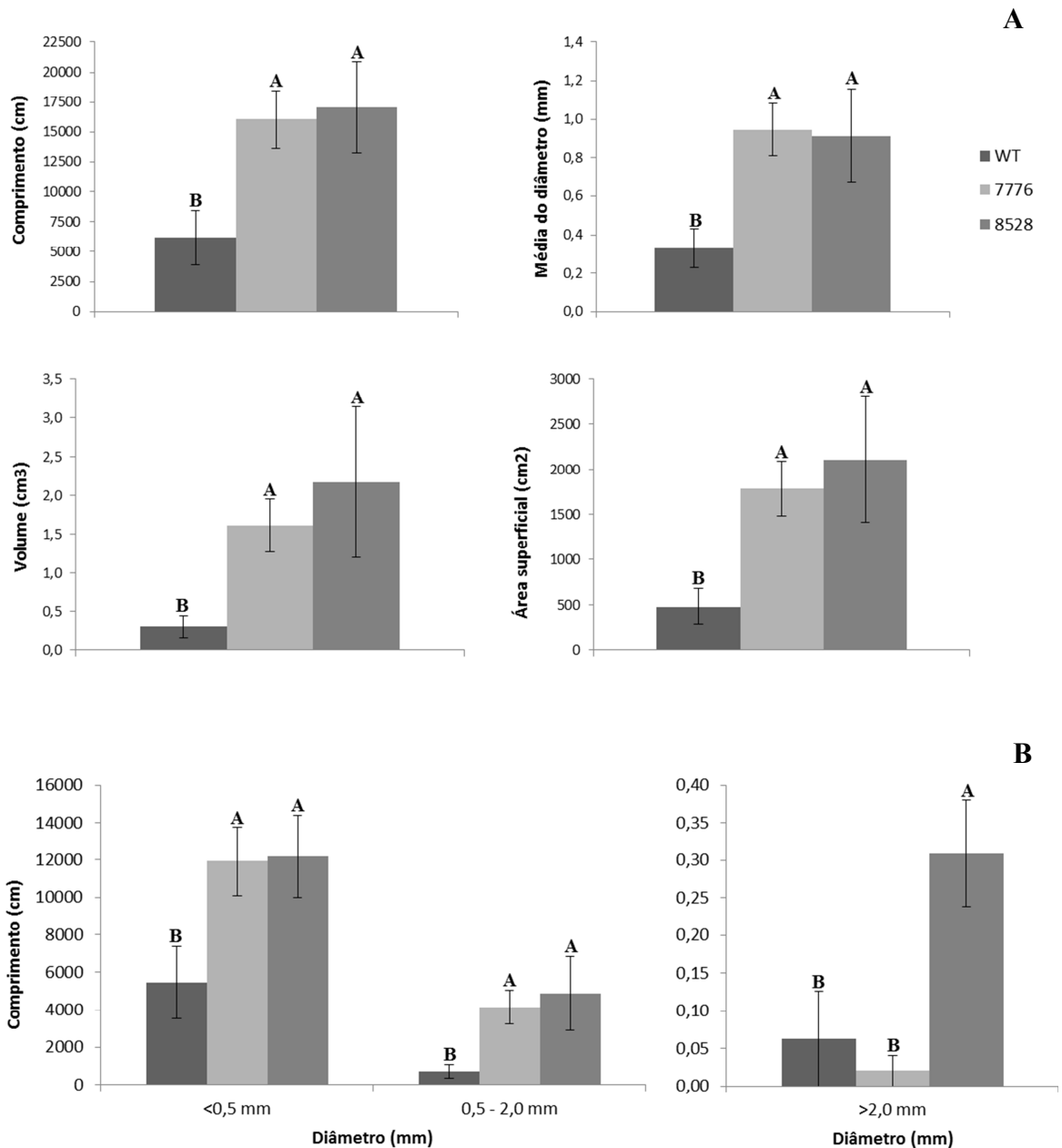


Figura 3 – Análises das raízes por meio do escaneamento e processamento no programa WinRhizo. A) Análises do comprimento total, média dos diâmetros, volume e área superficial. B) Classificação das raízes segundo o diâmetro. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Ao avaliar a massa de matéria seca dos genótipos, o mutante 8528 também se destacou com maior matéria seca da parte aérea e raiz, comparado aos demais (Fig. 4). Os dois mutantes apresentaram suas massas secas maiores que o tipo selvagem (Fig.5).

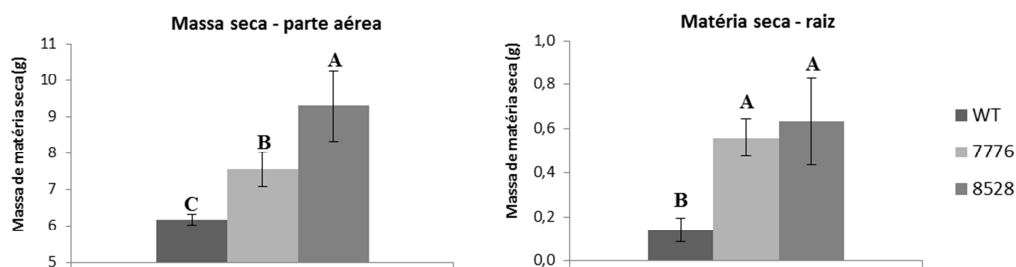


Figura 4 - Massa de matéria seca dos genótipos tipo selvagem e mutantes após aproximadamente 120 dias de cultivo em hidroponia. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

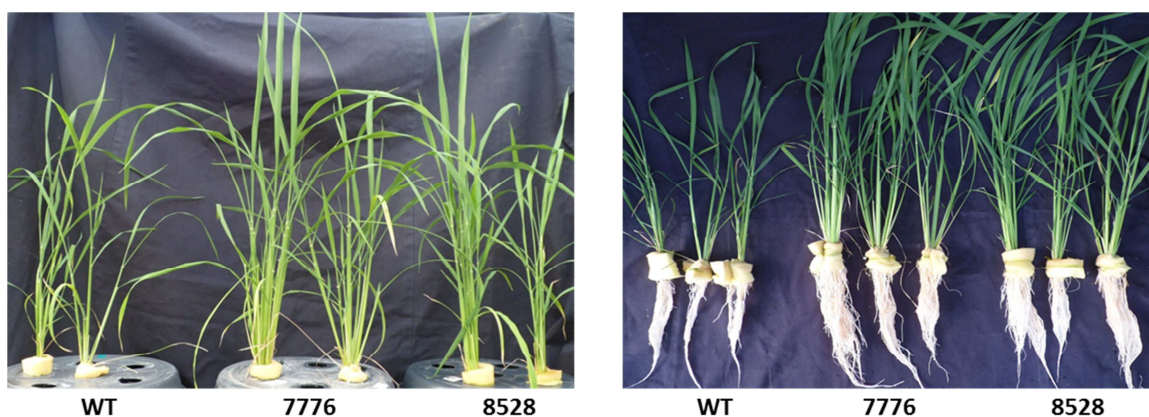


Figura 5 – Fenótipo das plantas tipo selvagem (WT) e mutantes (7776 e 8528) crescidos a aproximadamente 120 dias em hidroponia.

#### 4.1.2 O número de perfilhos não é alterado e os mutantes tem florescimento precoce

Mesmo apresentando maior crescimento e maior massa seca da parte aérea, ao avaliarmos a quantidade de perfilhos por planta, não foi encontrada diferença significativa entre os genótipos (Fig. 6). Porém ao analisarmos o número de panículas, foi observado um florescimento precoce dos mutantes, os quais, ao contrário das plantas WT, já apresentavam panículas aos 120 dias após o transplante para a solução hidropônica (Tabela 2).

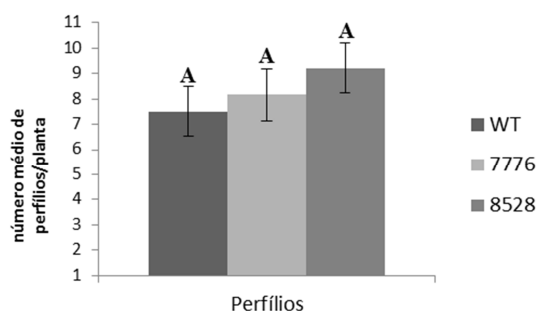


Figura 6 - Número médio de perfilhos por planta após 120 dias de cultivo em hidroponia. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2 – Efeito na formação de panículas. Número médio de panículas nas plantas tipo selvagem e mutantes para o gene *ABCB17*. Médias seguidas do erro padrão, valores com (\*) apresentam diferença significativa pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Genótipo	Número médio de panículas
WT	<b>0,00<math>\pm</math>0,00</b>
7776	<b>3,92<math>\pm</math>0,63A*</b>
8528	<b>1,92<math>\pm</math>0,69B*</b>

#### 4.1.3 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila não foram modificados.

Para avaliar possíveis razões que pudessem explicar o maior crescimento da parte aérea e radicular dos mutantes, algumas variáveis fisiológicas como, fotossíntese, condutância estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub>, taxa transpiratória e temperatura da folha foram quantificadas entre os genótipos, porém não foi encontrada nenhuma diferença significativa (Fig 7).

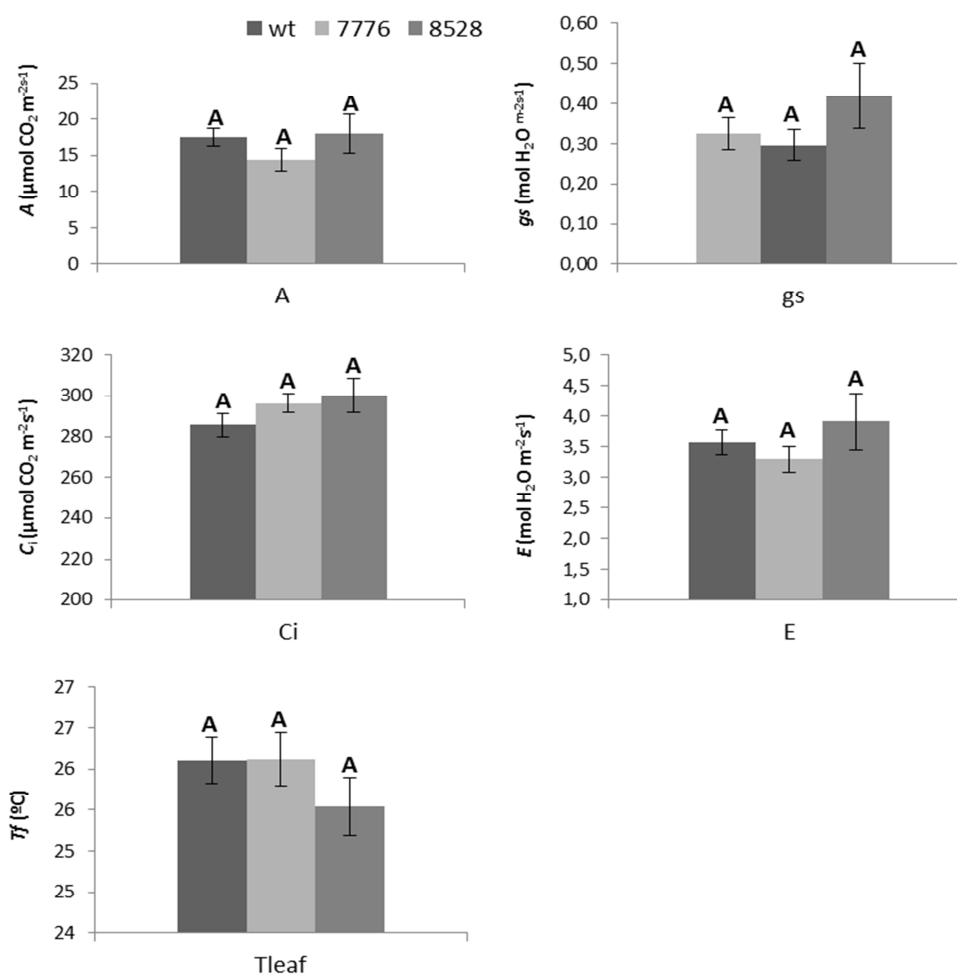


Figura 7 – Parâmetros de trocas gasosas obtidos *in situ* (taxa fotossintética (A), condutância estomática ao vapor de água (gs), concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) e taxa transpiratória (E)) em genótipos de arroz tipo selvagem e mutantes cultivados aproximadamente por 120 dias em hidroponia. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1.4 Redução na expressão do gene *ABC17* aumenta o teor lignina em um específico padrão temporal e espacial

O ferulato é um composto que faz parte da composição da lignina e suberina, e sua redução pode afetar o teor de lignina. De forma a obter maiores informações sobre as possíveis funções do gene, analisamos o teor de lignina total em diferentes órgãos e fases de desenvolvimento destes. Somente em folha dreno e bainha fonte foram observadas diferenciações entre os genótipos, apresentando um aumento na deposição de lignina total nos

mutantes (Fig. 8). Porém essa diferenciação não foi observada em análise histoquímica, como pode ser observado na figura 9.

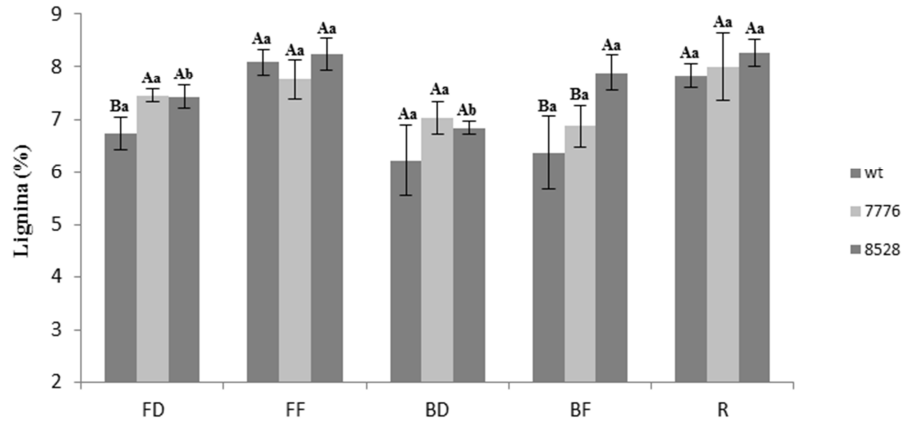


Figura 8 – Porcentagem de lignina nos tecidos de diferentes genótipos de arroz, WT, 7776 e 8528. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dentro um mesmo tecido vegetal, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias entre tecidos. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). FD: folha dreno; FF: folha fonte; BD: bainha dreno; BF: bainha fonte; R: raiz.

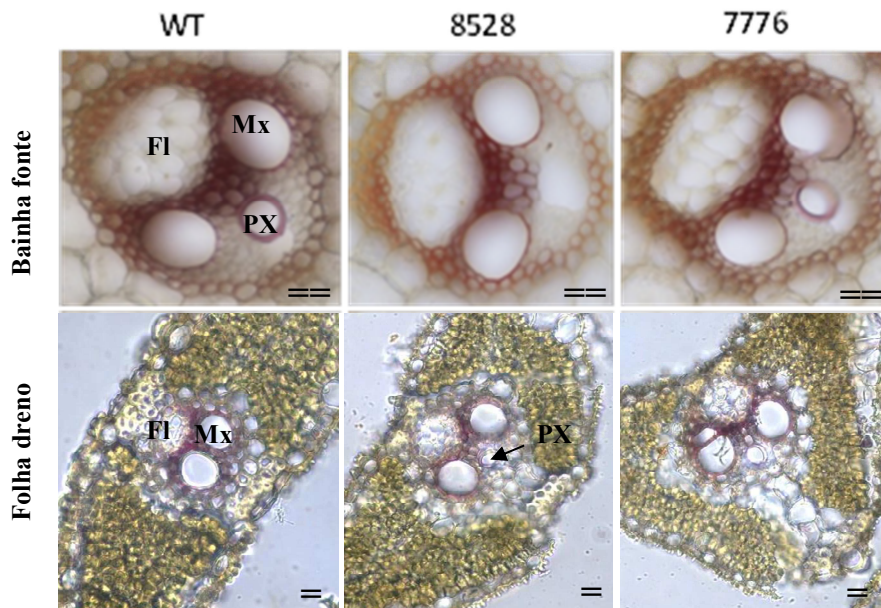


Figura 9 – Reação com floroglucinol para detecção de aldeído coniferil e lignina guaiacil (lignina G) em seções transversais de folha dreno e bainha fonte de arroz tipo selvagem e mutantes. Coloração vermelha indica reação positiva para lignina. FI: floema, MX: metaxilema, PX: protoxilema. Barra = 50  $\mu$ m.

#### 4.1.5 A expressão de alguns genes da rota da lignina foram afetados em diferentes órgãos nos mutantes *abcb17*

Na expectativa de entender a atuação do gene *ABCB17* no processo de transporte do ácido ferúlico ou sua atuação na rota dos fenilpropanóis, foi realizada uma análise de expressão relativa com alguns genes principais desse processo. O primeiro a ser avaliado foi o próprio gene *ABCB17*. Podemos observar que foi encontrada uma pequena expressão no mutante 7776, porém essa expressão foi nula no mutante 8528 em todos os tecidos.

Em relação as amostras de folhas, a expressão dos genes *PAL*, *CAD2*, *4CL3* e *COMT* é reduzida nos tipos mutantes em relação ao tipo selvagem, mostrando alguma relação na falta do gene *ABCB17* aos outros da rota em folhas.

Em bainha e raiz, as diferenças foram menores do que encontradas em folhas fontes. O gene *CAD2* também apresentou menor expressão em ambos mutantes nestes dois órgãos, porém não foi encontrada diferença de expressão nos outros genes (Fig. 10).

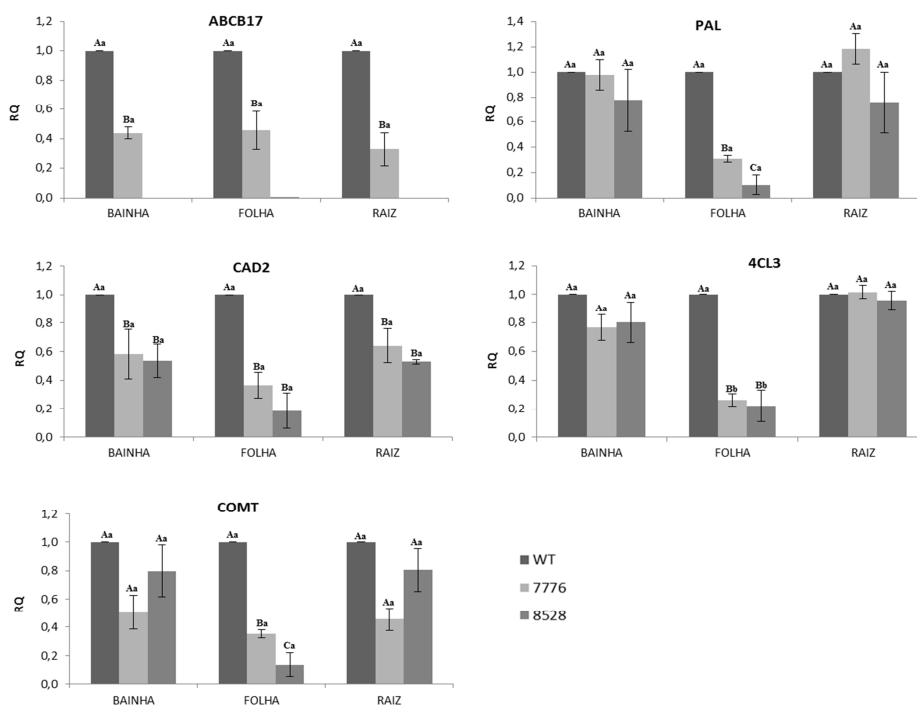


Fig 10 – Expressão relativa de alguns genes da rota de lignina, *4CL3*: 4-coumarate coenzyme A ligase; *PAL* phenylalanine ammonia lyase; *CAD2*: cinamil-álcool desidrogenase; *COMT*: ácido cafeico *O*-metiltransferase e o gene alvo *ABCB17*. Nível relativo da expressão gênica normalizada em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tecido, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os tecidos de um mesmo genótipo. Médias representam n=3 com três réplicas biológicas e três técnicas.

## **4.2 Análise da perturbação da homeostase do metabolismo de fenilpropanóides com a adição de ácido ferúlico e PIP**

### **4.2.1 Acréscimo de ácido ferúlico e PIP não alteram no crescimento aéreo e radicular das plantas**

O ácido ferúlico é um precursor da síntese de lignina. A adição de ácido ferúlico como aleloquímico em cultivos hidropônicos, pode afetar o metabolismo de lignina alterando características fisiológicas das plantas, e o ácido piperolínico (PIP), é conhecido como um inibidor da enzima C4H, que participa da rota da lignina. Em todos os parâmetros morfológicos analisados, como comprimento total, média dos diâmetros, volume e área superficial, as plantas controle (tipo selvagem) e os mutantes não apresentaram diferenças no crescimento das raízes após tratamento com ácido ferúlico e PIP por 15 dias. Porém, somente ao analisar média dos diâmetros que foi possível observar uma diminuição significativa quando o mutante 7776 foi submetido a tratamento com PIP (Fig 11A). Em análises complementares das raízes, onde as mesmas foram divididas segundo o diâmetro, foi observado que as raízes mais finas (menores que 0.5 mm) apresentaram o mesmo padrão de crescimento para todas as plantas, não apresentando diferenças após tratamento. Assim como, quando analisamos as raízes medianas, 0,5 a 2,0 mm de diâmetro. Em contrapartida, ao analisarmos as raízes mais grossas (acima de 2,0 mm), foi possível verificar que o mutante 8528 apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, apresentando uma maior quantidade de raízes grossas quando submetidos ao ácido ferúlico (Fig 11B).

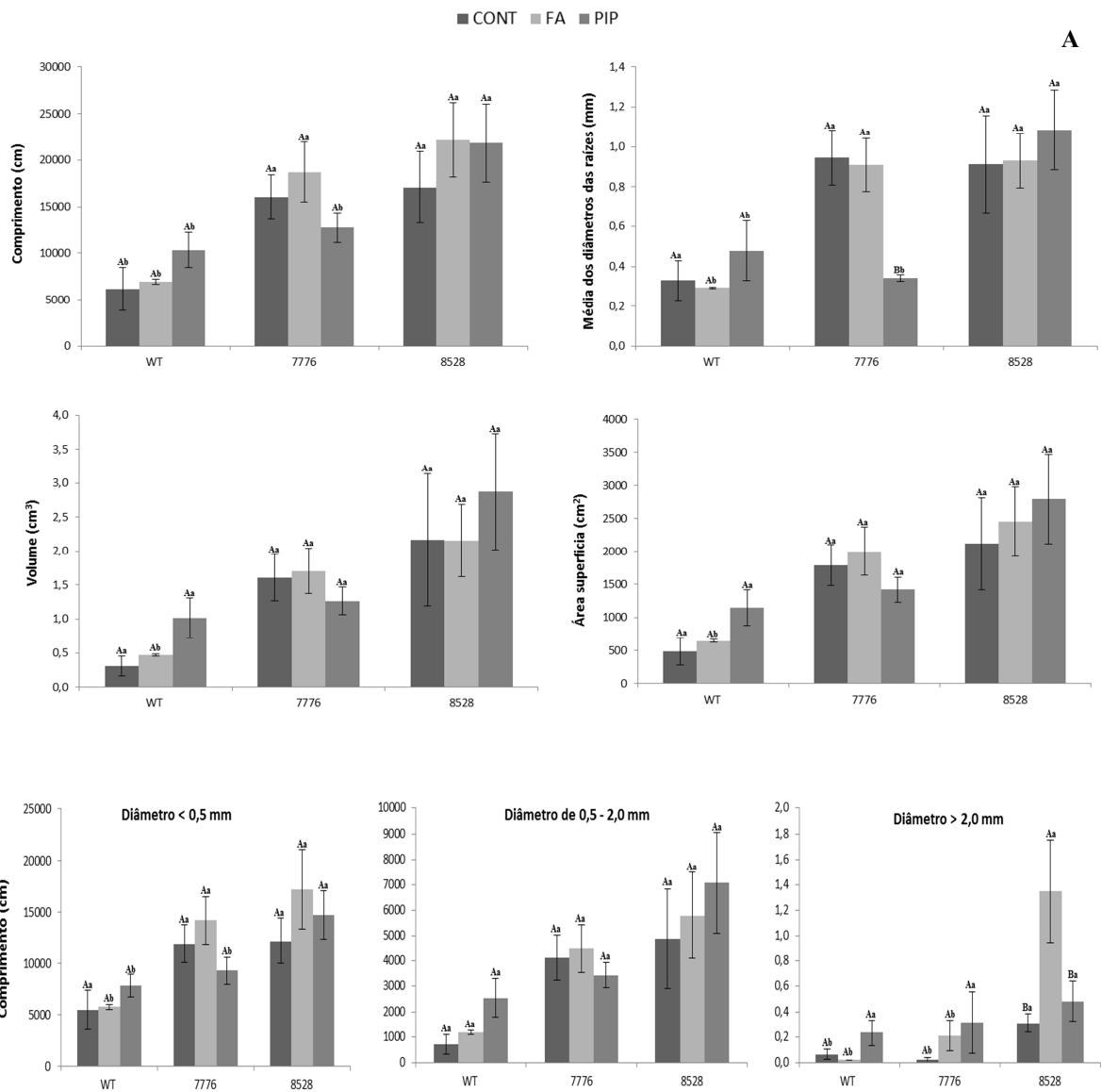


Figura 11 – Análises das raízes por meio do escaneamento e processamento no programa WinRhizo. A) Análises do comprimento total, média dos diâmetros, volume e área superficial. B) Classificação das raízes segundo o diâmetro. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em um mesmo genótipo sob tratamentos diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas dentro de um mesmo tratamento em diferentes genótipos. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Quando analisamos o teor de massa de matéria seca dos genótipos, novamente não foi observada diferença significativa nos genótipos após tratamentos (Fig.12).

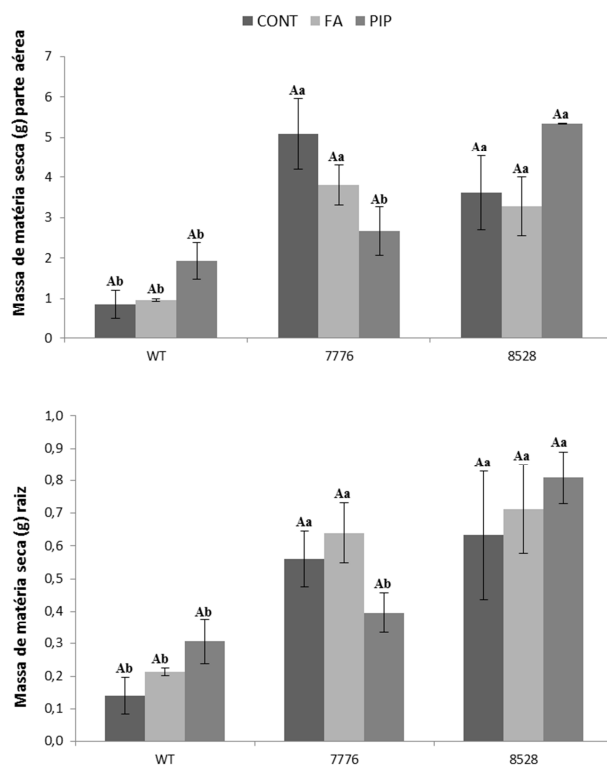


Figura 12 - Massa de matéria seca da parte aérea e de raiz, nos genótipos tipo selvagem e mutantes após 15 dias submetidos ao tratamento com FA e PIP. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em um mesmo genótipo sob tratamentos diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas dentro de um mesmo tratamento em diferentes genótipos. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2 A porcentagem de lignina é alterada em alguns órgãos após o tratamento com ácido ferúlico e PIP

A porcentagem de lignina foi alterada apenas em alguns órgãos após o tratamento com FA e PIP. Como é mostrado na figura 13, onde somente em folha (fonte e dreno) e em raiz foi possível observar uma variação na porcentagem de lignina. Em plantas WT, foi observado pequeno aumento da porcentagem de lignina em folhas dreno quando submetidas a tratamento com PIP, e uma diminuição quando analisamos em raiz. Já no mutante 8528, só pode ser

observada a diferença na porcentagem de lignina quando observadas em folhas fonte, onde houve também uma diminuição. O tratamento com FA não alterou a quantidade de lignina em nenhum genótipo.

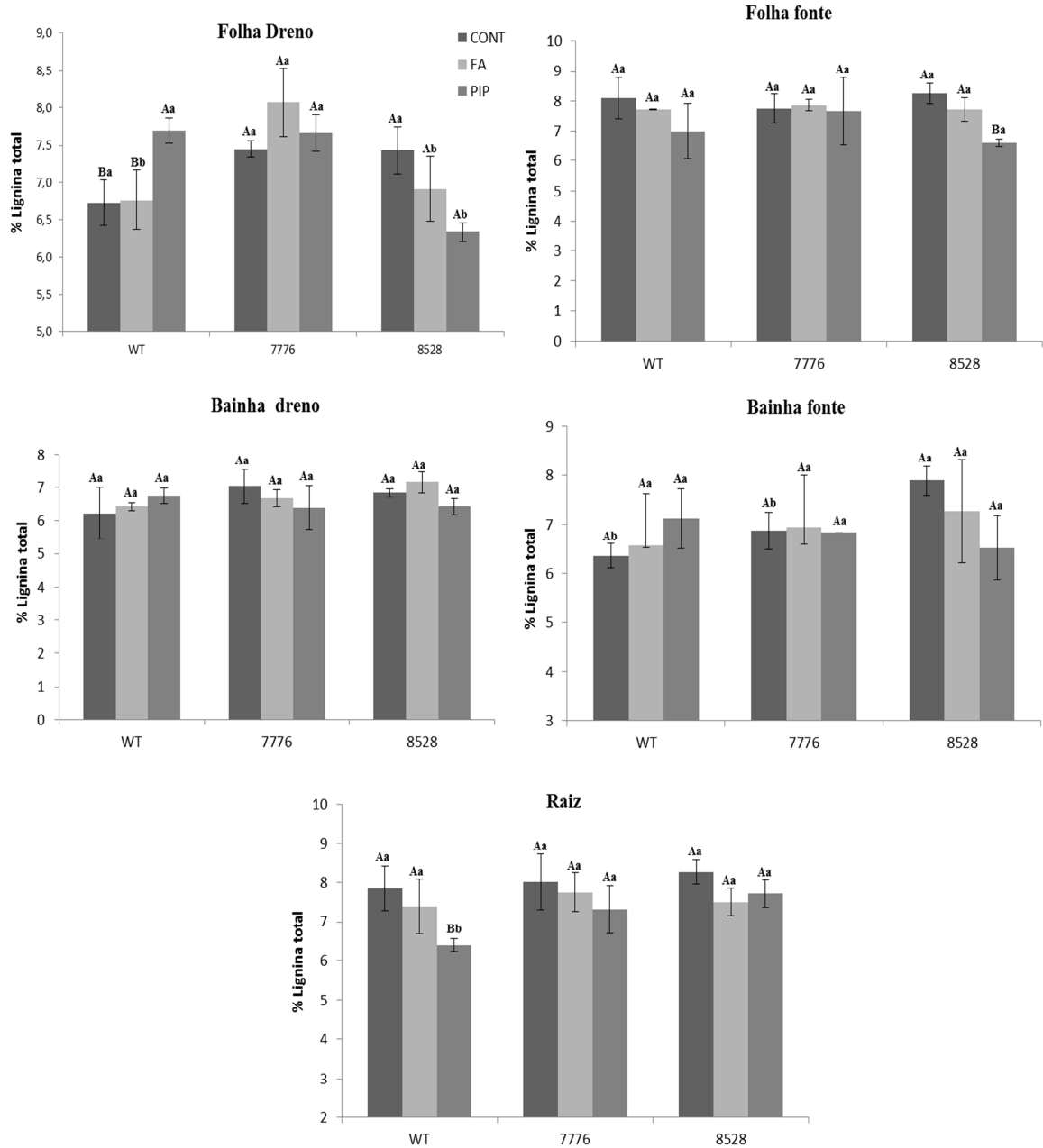


Figura 13 – Porcentagem de lignina nos tecidos de diferentes genótipos de arroz, WT, 7776 e 8528 submetidos ao tratamento com ácido ferulico e PIP. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em um mesmo genótipo sob tratamentos diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas dentro de um mesmo tratamento em diferentes genótipos. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Não foi encontrada diferença significativamente entre os genótipos pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

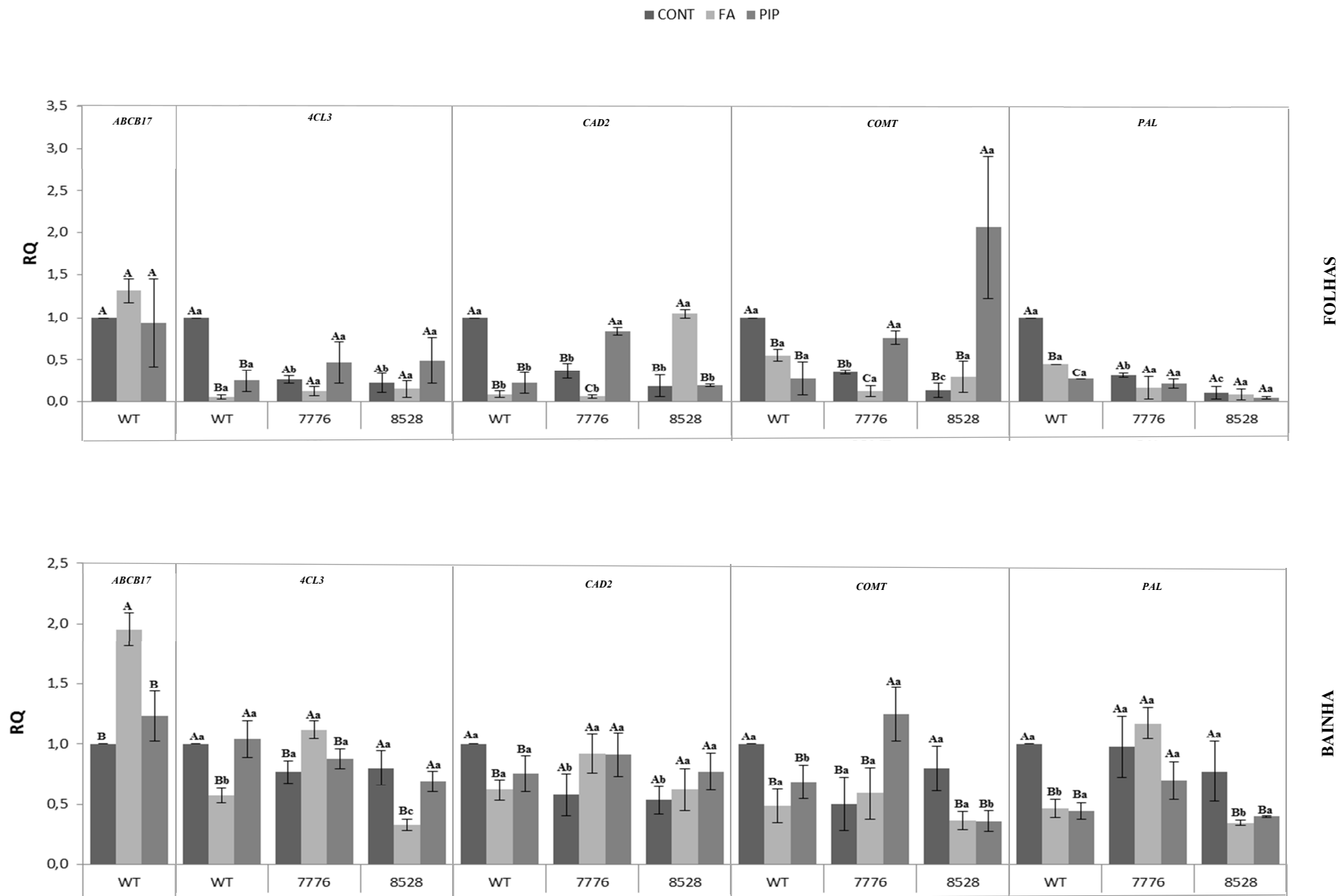
### 4.2.3 Tratamentos com ácido ferúlico e PIP alteram a expressão de alguns genes da rota dos fenilpropanóides

De forma a melhor entender os efeitos complexos observados no teor de lignina, procuramos observar os efeitos desta perturbação na homeostase na expressão dos genes desta rota metabólica. Primeiramente observamos que em tecidos foliares, as plantas WT não possuem diferenças de expressão do gene *ABCB17* após tratamentos com ácido ferúlico e PIP. Porém, esse mesmo genótipo, tanto na presença do ferulato como do PIP, em solução de hidroponia, tiveram uma redução na expressão dos quatro genes da síntese da lignina analisados nesse trabalho. Já nos mutantes, os tratamentos somente afetaram a expressão dos genes *CAD2* e *COMT*. O ácido ferúlico atua levando a redução da expressão desses genes no mutante 7776, porém proporciona o aumento da expressão do gene *CAD2* em plantas mutantes 8528. O tratamento com PIP levou a um aumento de expressão desses genes no mutante 7776 e no mutante 8528 somente o aumento da expressão foi encontrada no gene *COMT*. Então, para a folha, os genes *CAD2* e *COMT* podem ser considerados genes responsivos, pois eles alteraram a expressão em pelo menos um desses mutantes. E os genes *4CL3* e *PAL* como genes não responsivos, pois não alteram sua expressão.

Em tecidos da bainha, o gene *ABCB17* apresentou aumento de expressão em plantas WT submetidas ao ácido ferúlico, porém as plantas submetidas a PIP não tiveram sua expressão modificada. Nessas plantas WT, também foram observadas diferenças na expressão em todos os genes analisados após ambos os tratamentos, resultando na diminuição da expressão. Somente quando analisamos o gene *4CL3* observamos que a sua expressão não altera após tratamento com PIP. Em relação aos mutantes, podemos afirmar que os tratamentos alteram a expressão dos genes *4CL3*, *COMT* e *PAL*, diferentemente. Esses três genes, quando analisados no mutante 8528, tiveram uma diminuição das expressões após tratamento com FA. O mesmo aconteceu quando tratadas com PIP, porém a expressão do gene *4CL3* não foi alterada. Em relação ao mutante 7776, houve um aumento da expressão somente no gene *4CL3* quando submetidos ao tratamento com FA, e somente no gene *COMT* quando submetidos ao PIP. Para os outros genes a expressão não foi alterada. Não foi observada alteração na expressão no gene *CAD2* em ambos mutantes e ambos os tratamentos (Fig 14). Em relação a resposta dos genes ao tratamento nos mutantes, os genes *4CL3*, *COMT*

e *PAL* podem ser considerados genes responsivos, alterando sua expressão, e o gene *CAD2* como não responsivo após tratamento com FA.

Nos tecidos radiculares, a expressão do gene *ABCBI7* foi aumentada em plantas WT submetidas ao tratamento com PIP. Essas plantas WT também modificaram a expressão dos genes *4CL3* e *COMT* após tratamentos, diminuindo a expressão de ambos os genes após tratamento com FA e após tratamento com PIP diminuindo a expressão somente do gene *COMT*. Os outros genes *CAD2* e *PAL* não tiveram suas expressões alteradas após os tratamentos com FA e PIP em plantas WT. Em relação aos mutantes, a expressão foi modificada apenas do gene *PAL*, onde foi observada uma diminuição na expressão para ambos os tratamentos, porém somente para o mutante 7776, para o mutantes 8528 não foi observada variação na expressão genética (Fig 14).



( continuação...)

(... continuação)

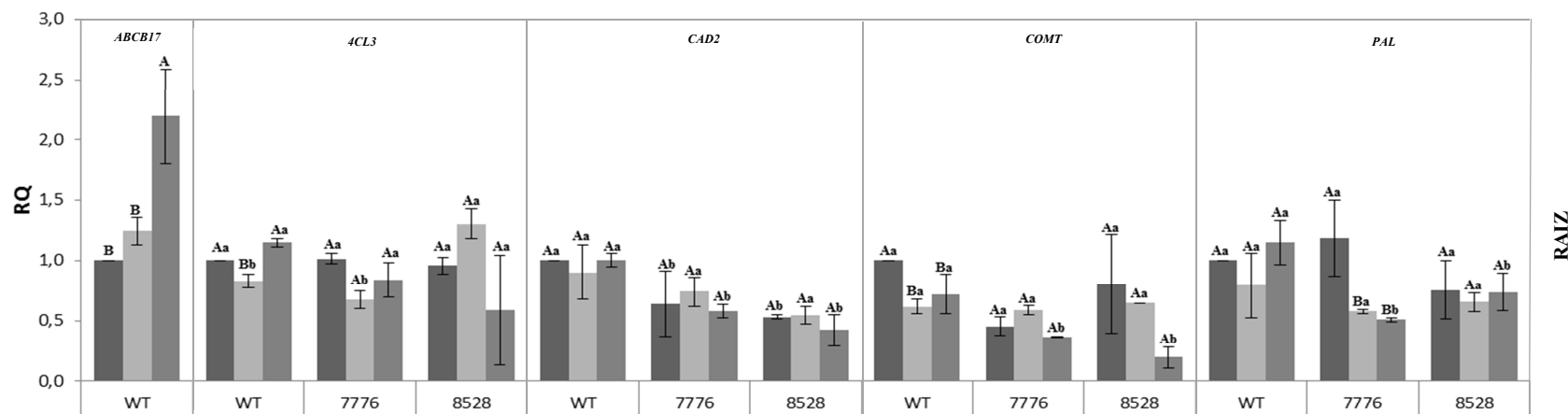


Fig 14 – Expressão relativa de alguns genes da rota de lignina, em diferentes tecidos submetidos ao tratamento com ácido ferúlico e PIP. *4CL3*: 4-coumarate coenzyme A ligase; *PAL* phenylalanine ammonia lyase; *CAD2*: cinamil-álcool desidrogenase; *COMT*: ácido cafeico *O*-metiltransferase e o gene alvo *ABCB17*. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em um mesmo genótipo sob tratamentos diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas dentro de um mesmo tratamento em diferentes genótipos. Nível relativo da expressão gênica normalizada em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos. Médias representam n=3 com três réplicas biológicas e três técnicas.

### **4.3 Efeito do estresse osmótico nos mutantes *abcb17***

#### **4.3.1 Mutantes *abcb17* não apresentam alterações na resposta da morfologia das raízes ao estresse osmótico**

A síntese de lignina é afetada pelo déficit hídrico, e o ferulato é também um importante componente da suberina, a qual afeta a condutividade hidráulica das plantas, sendo o gene *ABCB17* um possível transportador do ferulato, possivelmente podíamos encontrar alguma alteração nessas plantas submetidas ao estresse. Porém, ao contrário do que se esperava, as plantas WT e mutantes não apresentaram nenhuma diferença na morfologia das raízes após estresse (Fig 15). Nas análises de comprimento total, diâmetro, volume e área superficial não foram observadas variações nas plantas submetidas ao estresse osmótico. Mesmo quando analisamos as raízes separando-as em grupos segundo o diâmetro, não conseguimos observar variabilidade (Fig. 15).

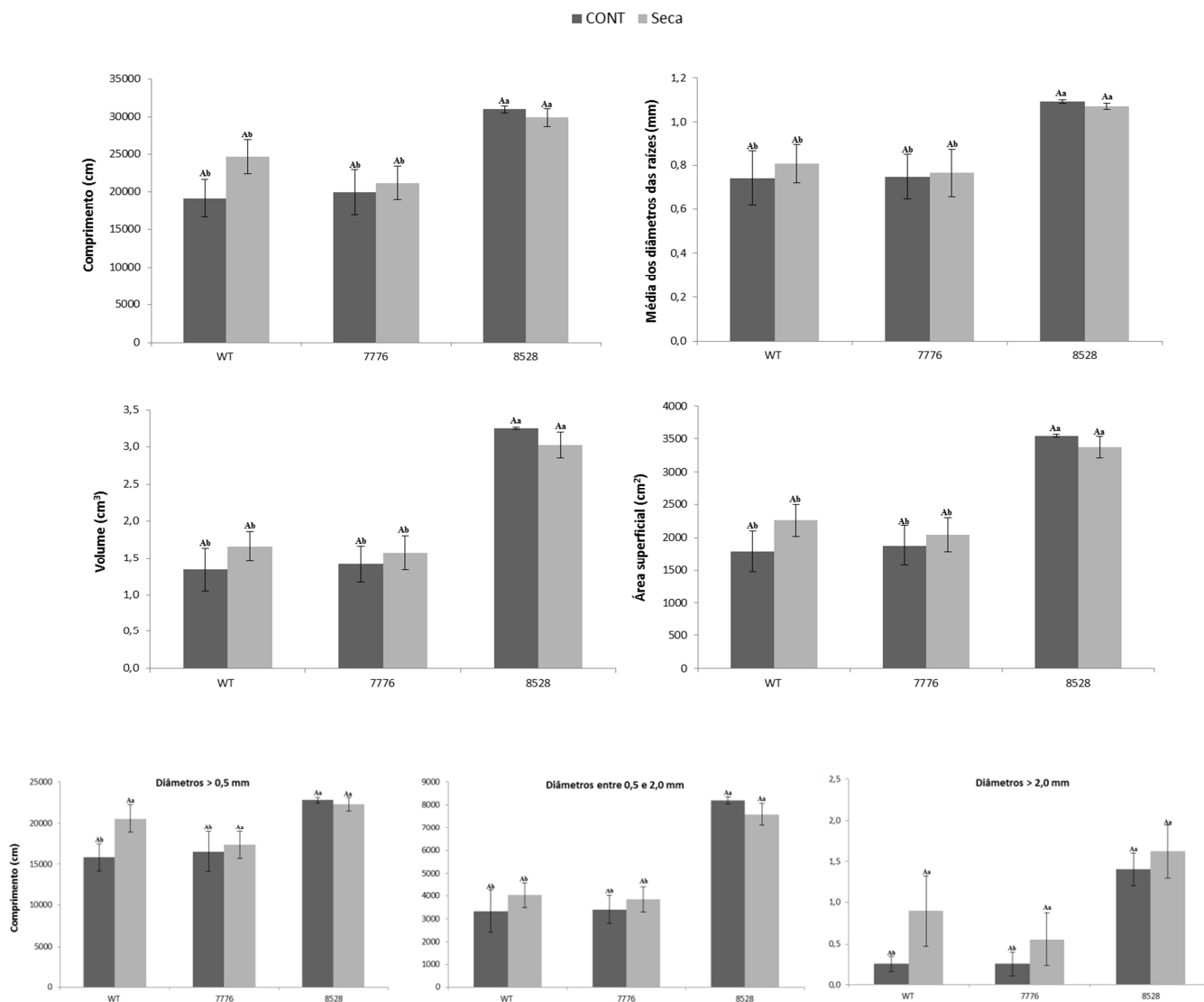


Figura 15 – Análises das raízes por meio do escaneamento e processamento no programa WinRhizo. A) Análises do comprimento total, média dos diâmetros, volume e área superficial. B) Classificação das raízes segundo o diâmetro. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em um mesmo genótipo sob tratamentos diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas dentro de um mesmo tratamento em diferentes genótipos. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.2 Mutantes sofrem maior desidratação foliar com o estresse osmótico

A maior sensibilidade das plantas mutantes ao estresse hídrico pode ser deduzida quando analisamos os dados de perda de água (redução do teor relativo de água, TRA). No 4<sup>o</sup> dia, somente o mutante 7776 apresentava maior desidratação do que as plantas controle sob

estresse osmótico. Entretanto, ao 7º dia após a imposição do estresse, ambos os mutantes apresentavam uma maior desidratação foliar (Fig 16A). Também podemos observar que todos os genótipos conseguiram se recuperar após o estresse, observando o mesmo teor de água após a reidratação (Fig 16B).

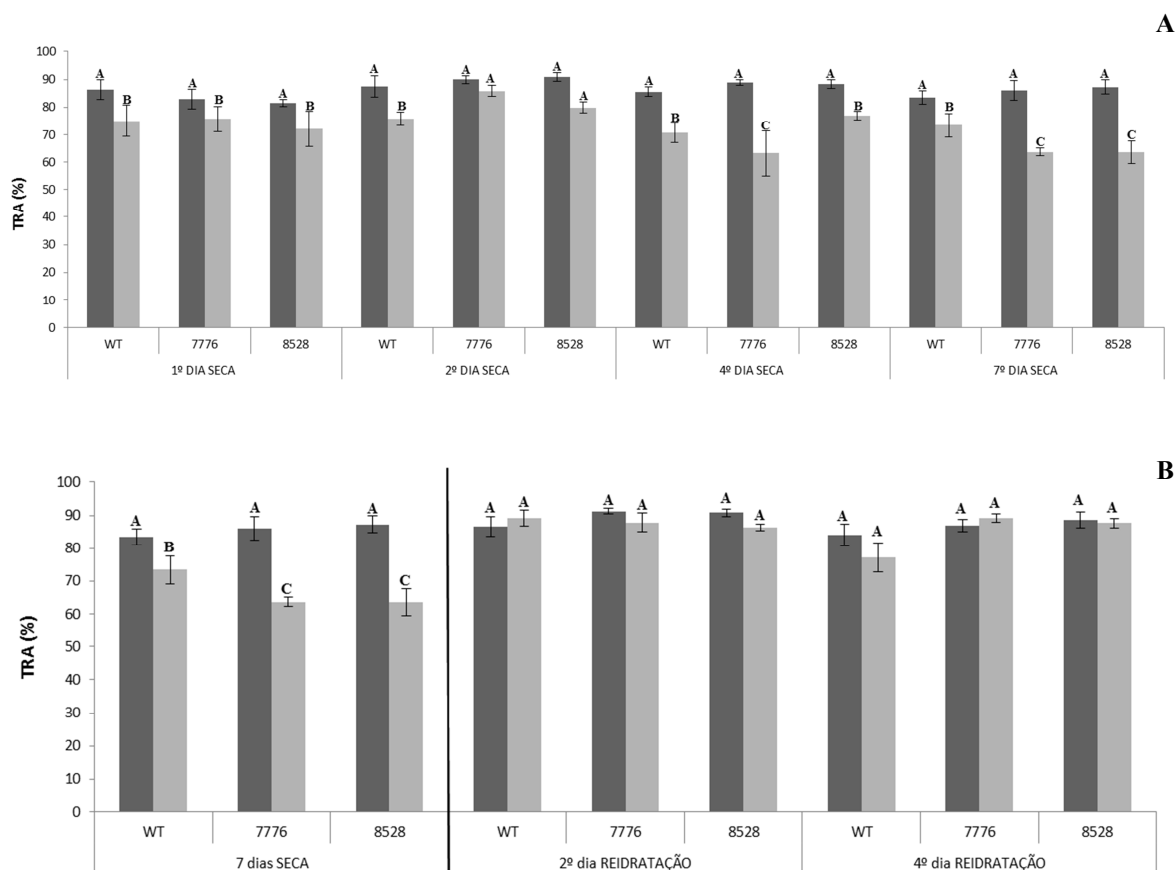


Figura 16 – Análise do teor relativo de água nas plantas de arroz tipo selvagem e mutantes submetidas a déficit hídrico. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.3 Plantas mutantes possuem menor massa seca da parte aérea quando submetidas por 7 dias ao estresse osmótico

Quando analisamos a massa de matéria seca, foi observada uma maior diminuição na parte aérea dos mutantes, porém nas raízes não foi possível observar diferença significativa após o tratamento (Fig. 17). Ao analisarmos o teor relativo de água podemos observar que as plantas mutantes tiveram uma maior diminuição no teor de água em relação as plantas WT, mostrando uma menor capacidade de manter a água nos seus tecidos (fig.16).

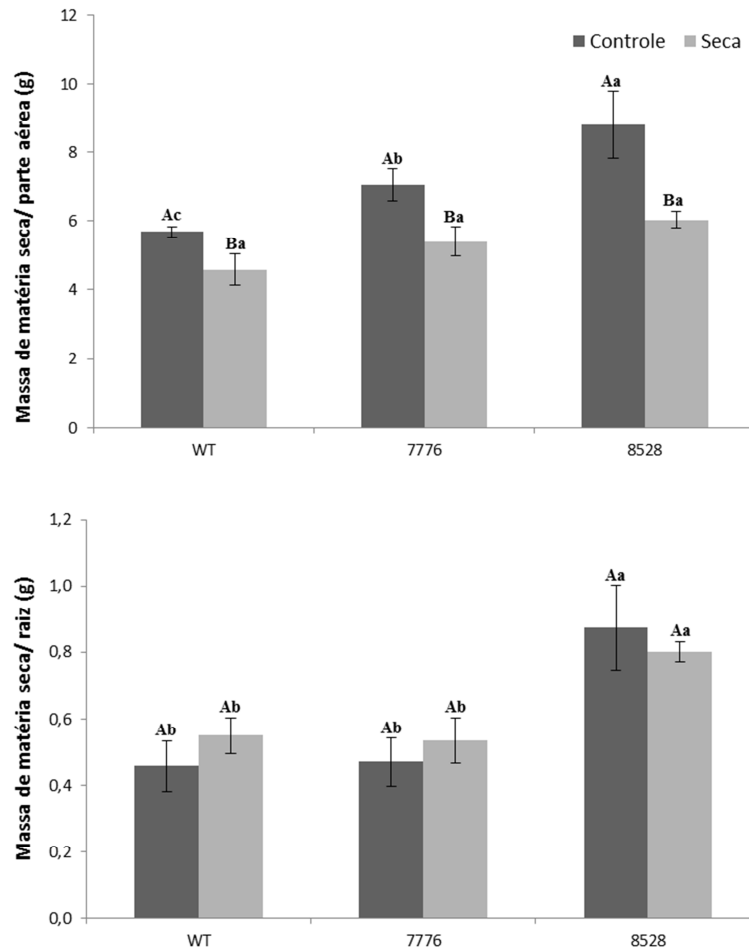


Figura 17 - Massa de matéria seca da parte aérea e de raiz, nos genótipos tipo selvagem e mutantes após 7 dias submetidos a seca. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em um mesmo genótipo sob tratamentos diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas dentro de um mesmo tratamento em diferentes genótipos. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.4 Diferenças no crescimento e desidratação foliar não são relacionadas com alterações nas trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila

Nas análises fisiológicas de fotossíntese, condutância estomática, concentração interna de  $\text{CO}_2$ , taxa de transpiração e temperatura da folha, foram observadas diferenças significativas em todos os genótipos após o déficit hídrico, indicando que houve realmente um estresse osmótico na planta. E quando essas plantas foram submetidas a reidratação todos os parâmetros foram igualados às plantas sem estresse (Fig. 18 e 19). Assim como nos valores de

fluorescência da clorofila, em que a razão  $F_v/F_m$  manteve-se estável com valores próximos 0,80 após o tratamento com seca, demonstrando a ausência de fotoinibição (Fig. 20). Dados de densidade estomática também foram avaliados não indicando variações entre os genótipos e tratamentos (Fig. 21). Todos esses resultados confirmam que estes mutantes não diferiram na fotossíntese e trocas gasosas das plantas controle, apesar de possuírem maior desidratação foliar e menor crescimento foliar sobre estresse osmótico.

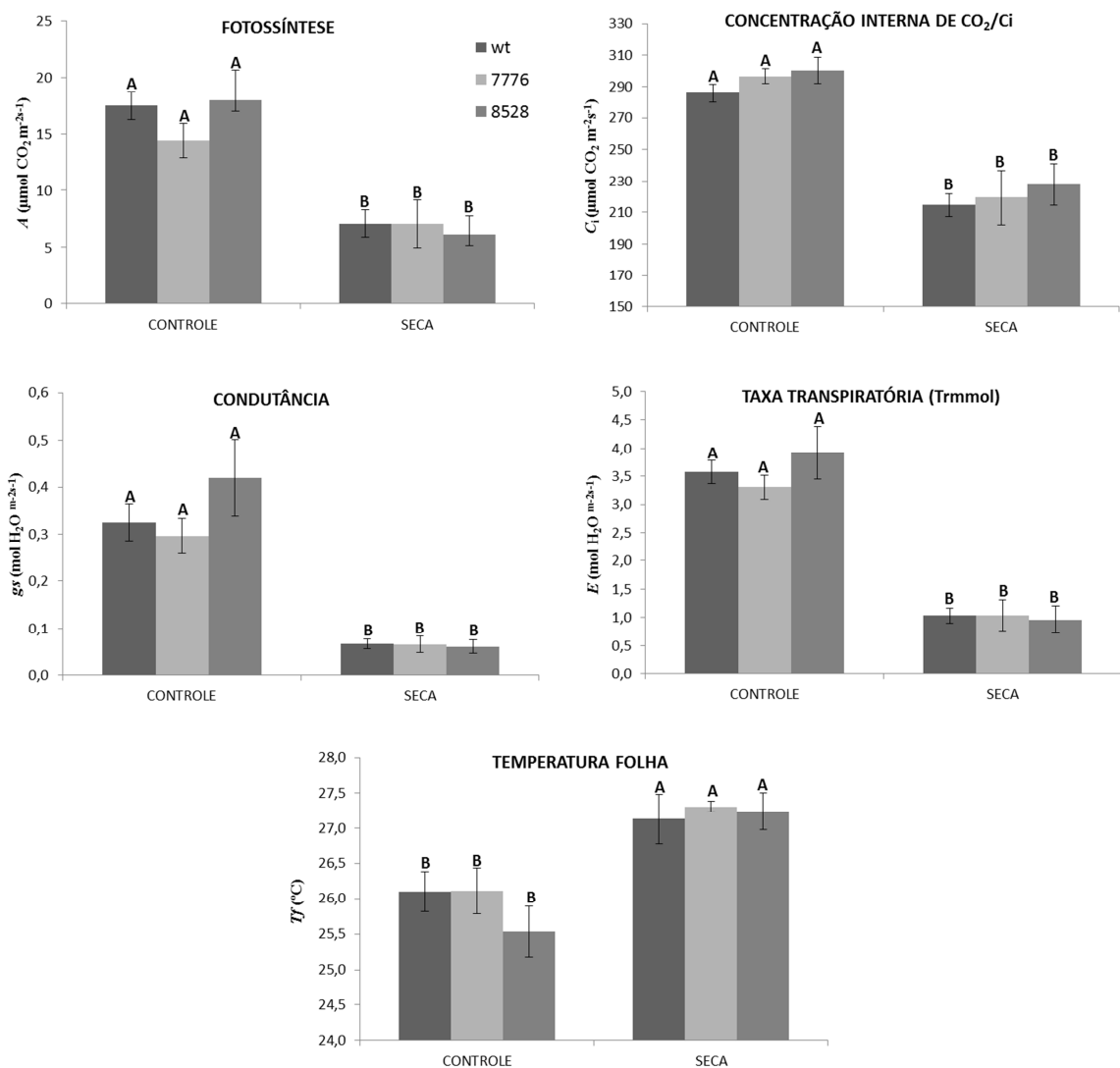


Figura 18 – Efeitos fisiológicos da seca nos genótipos analisados:  $A$ , taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ ;  $g_s$  condutância estomática;  $C_i$  concentração interna de  $\text{CO}_2$ ;  $E$ , transpiração;  $T_{leaf}$ , temperatura da folha após sete dias de exposição a seca.

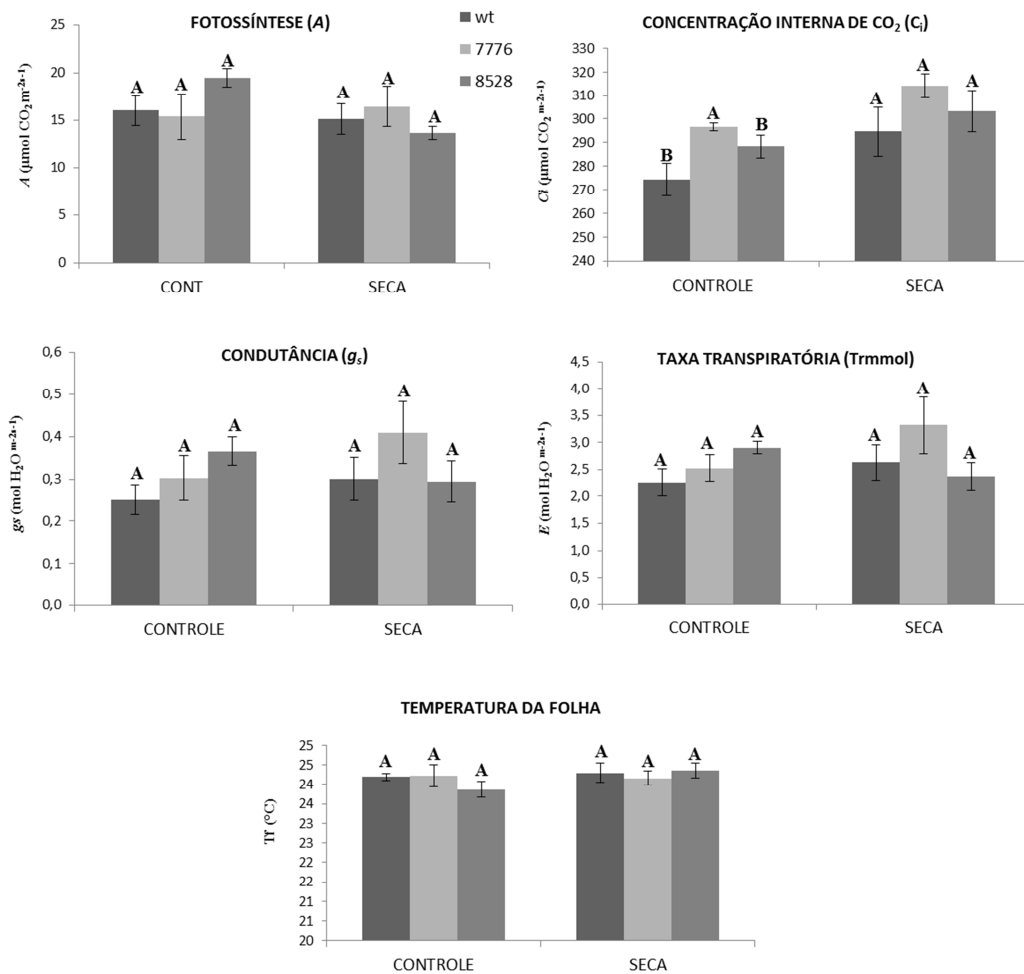


Figura 19 – Efeitos fisiológicos da seca nos genótipos analisados após reidratação: *A*, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; *g<sub>s</sub>*, condutância estomática; *C<sub>i</sub>*, concentração interna de CO<sub>2</sub>; *E*, transpiração; *Tleaf*, temperatura da folha.

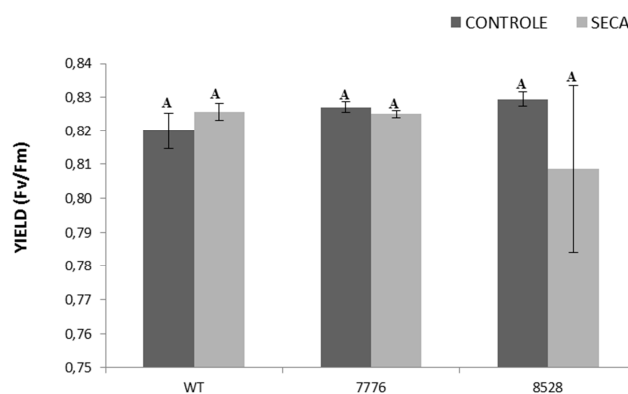


Figura 20 – Valores de fluorescência da clorofila *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* para os genótipos analisados. Barras representam médias ± erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

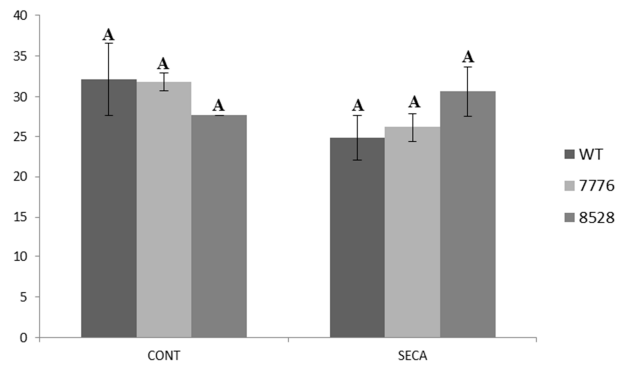


Figura 21 – Densidade estomática dos genótipos tipo selvagem e mutantes submetidos a seca. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos mutantes

Os mutantes foram submetidos a várias análises para simples caracterização, no intuito de avaliar quais as possíveis variações que podem ocorrer nessas plantas com a falta do gene *OsABCB17*. Uma caracterização inicial foi realizada por Anne Sophie Knoeller, em 2009, como parte de seu trabalho para obtenção do título de PhD pela Universidade de Purdue, EUA. Neste trabalho foi realizado a simulação *in silico* por bioinformática do possível substrato para vários transportadores ABC, e ao contrário de todos os outros genes da família ABC, o gene *ABCB17* apresentou uma possível afinidade ao ácido ferúlico. A partir disso, algumas análises foram realizadas a fim de determinar *in vivo* a real função desse gene. Uma dessas análises envolveu a aplicação de ácido ferúlico em leveduras (*S. pombe*) transformadas com o gene, no qual foi observada a toxicidade ao ferulato, possivelmente devido ao transporte dessa substância para o interior da levedura (dados não publicados). Com todos esses indícios, esse trabalho visa uma complementação do estudo da função do gene *ABCB17* com mutantes de arroz, acreditando que a falta desse gene pode de alguma forma alterar o metabolismo, influenciando em alguns parâmetros da planta no crescimento e desenvolvimento, principalmente em relação ao metabolismo da lignina.

Como o gene *ABCB17* possivelmente atua no transporte do ácido ferúlico, que é uma das principais moléculas que fazem parte da via dos fenilpropanóis (Ou e Kwok, 2004) participando da formação da lignina, o estudo da variação do teor de lignina em plantas mutantes para esse gene é de extrema importância para caracterizar sua possível função. Porém, contrariando nossa hipótese inicial de que a falta do gene diminuiria o teor de lignina, obtivemos resultados os quais os mutantes apresentaram o teor de lignina aumentado, e essas alterações somente ocorreram nos tecido foliares dreno e bainha fonte. Em folha dreno ambos os mutantes aumentaram em aproximadamente 10% o teor de lignina, em bainha fonte, somente o mutante 8528 apresentou um aumento de 24%. Entretanto, essas discretas alterações não foram confirmadas nos estudos histoquímicos a qual é um método pouco sensível para detectar poucas diferenças.

Apesar disso, quando analisamos a expressão de alguns genes importantes na rota da lignina, verificamos que vários genes tiveram uma redução na sua expressão. Essas reduções nos levaram a um aparente paradoxo, pois em folhas dreno, onde foi observado um aumento

no teor da lignina, todos os genes apresentaram alterações negativas na sua expressão nos mutantes. E ao analisarmos outros tecidos, observamos que em bainha dreno e raiz dreno, ambos tecidos jovens que não apresentaram modificação na porcentagem de lignina, houve redução na expressão do gene *CAD2*. No tecido que apresentou um aumento no teor da lignina, todos os genes da rota dos fenilpropanóides analisados tiveram sua expressão reduzida, e nos tecidos que não variaram o teor de lignina a expressão do gene *CAD2* também foi reduzida.

Em primeira análise, era esperado que o aumento da lignina estivesse de alguma forma relacionado diretamente ao aumento da expressão dos genes da rota, porém a rota dos fenilpropanóides, assim como na maioria das grandes rotas, é composta de inúmeros genes e muitos desses genes se sobrepõe nessa rede complexa, onde nem sempre a redução de um determinado gene, necessariamente leva a redução da proteína final. O gene *CAD2*, por exemplo, que teve sua expressão reduzida em todos os tecidos, são encontrados mais de 12 tipos em arroz, porém Hirano e colaboradores em 2012 analisaram a expressão de 9 desses genes, e encontraram que o gene *OsCAD2*, o mesmo utilizado nesse trabalho, teve uma maior expressão, cerca de sete vezes maior, porém eles também perceberam que nem sempre essas maiores expressões modificaram a quantidade de lignina nas plantas, dependendo do tecido analisado. Outros genes *CAD* estão envolvidos nessa rota e a alteração de um pode simplesmente não modificar no resultado final. Além do mais, a expressão sempre precede a acúmulo de lignina, outras regulações podem ocorrer em toda a etapa. E a diminuição da expressão de um gene pode causar a indução da expressão de outros, o que balanceará a produção final. Esse fenômeno foi observado em mutantes *CCR* de *Arabidopsis*, onde a mutação *CCR1* induziu a expressão do gene *CCR2* (Mir Derikvand *et al.* 2008). Como a via dos fenilpropanóides é um grande complexo enzimático, e no presente trabalho foram avaliados somente alguns genes dessa rota, a diminuição da expressão pode não alterar o teor de lignina, ou simplesmente alterar somente na sua composição (dados não testados). De qualquer forma, a falta do gene *OsABCB17* de alguma forma modificou a expressão dos genes, principalmente em folhas.

Outros paradoxos como esse já foram descritos na literatura. Em 2013 Cheng e colaboradores encontraram em plantas de *Ginkgo biloba* alguns tecidos jovens com uma concentração relativamente pequena de lignina e uma expressão alta do gene *CAD*. E em alguns tecidos menos jovens, a expressão fraca ou muitas vezes nula desse gene, se contrapôs a abundância de lignina nesses tecidos. Um contraste também encontrado a um ano atrás por

Cheng estudando o gene *CCR1*. Porém apenas para alguns tecidos em fases diferentes de desenvolvimento, não sendo considerada uma regra, pois para muitos houve o aumento da expressão do gene e do teor de lignina. Alguns estudos com transgênicos de expressão reduzida do gene *CAD* em tabaco, *Populus* e alface tem demonstrado que níveis gerais de lignina são em muitos casos não afetados pela baixa expressão do gene *CAD* (Baucher *et al.*, 1996, 1999; Halpin *et al.*, 1994; Hibino *et al.*, 1995).

Quando avaliamos a expressão do gene *OsABCB17*, podemos observar uma drástica redução da expressão no mutantes 7776, e no mutante 8528 a falta de expressão desse gene. Essas plantas foram obtidas a partir da mutação com o transposon *TOS7*, que é um endógeno retotransposon, eficientemente usado para produzir nocautes em plantas de arroz, porém possui uma alta frequência de mutações (Greco *et al.*, 2001). Essa mutação é induzida a partir da cultura de tecido (Hirochika 2001), acredita-se que esse transposon pode ter novamente se deslocado no mutante 7776, introduzindo em outra parte do genoma, fazendo com que a expressão do gene *OsABCB17* sofra uma diminuição da sua expressão.

As plantas mutantes apresentaram diferenças no desenvolvimento em comparação com as selvagem, tanto no desenvolvimento aéreo como no radicular. Os mutantes apresentaram maior crescimento radicular e aéreo, maior massa seca e florescimento precoce. No mutante 8528 houve um maior desenvolvimento radicular. Nenhuma relação entre as trocas gasosas pode ser usada para explicar modificações no desenvolvimento, pois não foram encontradas diferenças significativas. A única hipótese que temos para este fato, é de que provavelmente a menor alocação de carbono e energia para a síntese de lignina, resultou em maior disponibilidade de esqueletos carbônicos para sustentar o crescimento das plantas.

## **5.2 Efeito do ácido ferúlico e PIP**

De reconhecida característica alelopática, o ácido ferúlico interfere em muitos processos vitais das plantas, sendo, entre os efeitos mais conhecidos, a redução do crescimento das plantas e o aumento na síntese de lignina. O estresse com ácido ferúlico reduz a utilização da água, inibe a expansão foliar e alongação da raiz, reduz as taxas de fotossíntese e inibe a absorção de nutrientes. A nível celular, o aleloquímico induz a peroxidação dos lipídios, afetando certas atividades enzimáticas e rapidamente despolariza as

membranas celulares das raízes causando um aumento generalizado da permeabilidade da membrana (Weir *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, o ácido ferúlico pode ser esterificado, incorporado na estrutura da lignina, ou formando pontes que conectem a lignina com a parede de polissacarídeos, fazendo com que a parede celular fique mais rígida, restringindo o crescimento (Iiyama *et al.* 1990; Sánchez *et al.* 1996; Lam *et al.*, 2001). Produzido pela maior parte das monocotiledôneas (Smith & Harris, 2000), o ácido ferúlico é parcialmente responsável pelo efeito das gramíneas inibindo o crescimento de outras plantas, sobretudo dicotiledôneas (Rodrigues *et al.*, 1999).

Em inúmeros trabalhos o FA atuou causando modificações em vários aspectos, como alterações no crescimento das raízes e aumento do teor de lignina (dos Santos *et al.*, 2004; dos Santos *et al.*, 2008; Zanardo *et al.*, 2009; Bubna *et al.*, 2011), pois o crescimento das raízes é caracterizado por uma alta atividade metabólica, tornando-as particularmente susceptíveis a estresses aleloquímicos durante o seu curso normal de desenvolvimento (Bubna *et al.*, 2011). No entanto, no presente trabalho, as plantas de arroz tipo selvagem e mutantes *abcb17* não sofreram nenhuma alteração no crescimento, massa seca e teor de lignina no tratamento efetuado com a aplicação de ferulato na solução hidropônica. O fato de que os resultados aqui apresentados não coincidam com os citados na literatura deve-se, possivelmente, por todos esses trabalhos terem utilizados plântulas, recém germinadas, e no nosso trabalho, utilizamos as plantas com aproximadamente dois meses de crescimento em hidroponia. A absorção de FA é mais alta nos estágios iniciais de desenvolvimento, sendo também a fase fisiológica onde a lignificação começa (dos Santos *et al.* 2004; Passardi *et al.* 2005).

Embora não tenhamos observado fenótipos morfológicos ou bioquímicos, ao analisarmos a nível transcricional, a adição de ácido ferúlico nas plantas em hidroponia alterou diferentemente a expressão de alguns genes, na grande maioria diminuindo a expressão. Em folhas, quando se analisa somente as plantas WT, a expressão dos genes *4CL3*, *CAD2*, *COMT* e *PAL*, teve o efeito drástico do alelopático ácido ferúlico para todos esses genes, reduzindo suas expressões. Enquanto que quando analisamos os mutantes podemos observar que eles sofreram alterações somente nos genes *CAD2* e *COMT*. Desta forma, essa relação dos genes ao tratamento com FA nos mutantes, podemos dividir os genes em duas classes: genes que tem expressão alterada após os tratamentos (genes responsivos) *CAD2* e *COMT*, e genes não responsivos, onde não foram observadas diferenças na expressão em nenhum mutante (*4CL3* e *PAL*). Este menor efeito nos mutantes pode estar associado a hipótese de que os mutantes teriam maior fluxo de síntese de lignina. Desta forma, os níveis

de FA seriam maior nas plantas WT em folhas, havendo um efeito inibidor maior neste órgão nestas plantas. As medições de ácido ferúlico estão em andamento para testar a validade desta hipótese.

Em bainha o efeito do ácido ferúlico foi mais complexo, diferenciando os mutantes entre si para a respostas de alguns genes. Enquanto as plantas tipo selvagem também apresentaram a redução da expressão dos quatro genes estudados, no mutante 7776 houve aumento na expressão do gene *4CL3*, enquanto no mutante 8528, como nas plantas WT, houve redução. Os mutantes também diferem na resposta do gene *COMT* e *PAL*, ao passo que foi observada a redução para o mutante 8528, e no mutante 7776 não houve alteração na expressão. Em resumo, observamos que na bainha, o ferulato tem um efeito semelhante nas plantas WT em inibir a expressão de vários genes, ao passo que no mutante os efeitos são distintos. O mutante 7776 apresenta expressões diferentes de ambas outras plantas para todos os genes estudados. Neste mutante observamos também outros tipos de diferenças em relação ao mutante 8528, e acreditamos que isso possa ser devido ao movimento do transposon de forma aleatória entre os diferentes órgãos para este mutante, como descrito acima.

E em tecidos radiculares, as plantas tipo selvagem tiveram a alteração da sua expressão somente nos genes *4CL3* e *COMT*, enquanto que somente o gene *PAL* pode ser considerado um gene responsivo no mutante 7776, mostrando novamente a diferença entre os mutantes.

Essas variações nas expressões diferentemente em tecidos e genótipos diferentes, podem ser explicadas pelo fato de vários genes estarem envolvidos nessa rota, muitas vezes com funções homólogas, e diferentemente em cada tecido e estágio de desenvolvimento da planta. Em plantas superiores, múltiplos genes *CAD* homólogos podem participar da biossíntese de lignina em diferentes tecidos ou durante diferentes estádios de desenvolvimento de um tipo de tecido. *Arabidopsis thaliana* tem nove genes *CAD* funcionais, porém somente *AtCAD4* e *AtCAD5* possuem papel chave na rota da lignina. Esses dois genes são expressos em tecidos vasculares assim como em tecidos não-lignificados (Kim *et al.*, 2007; Sibout *et al.*, 2003). Análise da expressão em tecidos-específicos revelaram que *CAD4* participa na biossíntese de lignina, mas é fracamente expresso em caule. Em contraste, foi fortemente expresso em flores e raiz (Tronchet *et al.*, 2010). Desta forma, nem sempre os genes analisados estão diretamente envolvidos com a síntese de lignina, porém podemos perceber que a adição de ácido ferúlico modificou de alguma forma a homeóstase desses genes, mesmo não apresentando modificações finais no teor de lignina.

Em relação a alguns desses genes, dezenas de trabalhos tem descrito a relação da atividade dessas enzimas com o tratamento com FA. Em um desses trabalhos, Santos e colaboradores em 2008, determinaram que a atividade de *CAD*, uma enzima chave nos processos finais de formação dos monolignóis, foi diminuída após tratamento com FA em soja, e o teor de lignina aumentado nas raízes.

Outro gene analisado é o *PAL*, que sintetiza a primeira enzima geral da via de fenilpropanois, que catalisa a desaminação mono oxidativa da fenilalanina a ácido trans-cinâmico e NH<sub>3</sub> (Sewalt *et al.*, 1997). Muitos trabalhos mostram a ineficiência do alelopático em relação a enzima *PAL* de batata (*Ipomea batatas*) e pera (*Pisum sativus*) (Sato *et al.*, 1982), em raízes de pepino (*Cucumis sativus*) (Shann & Blum, 1987). Porém, em outros o aumento da atividade *PAL* foi associada com a redução das raízes após 24 e 48 h de tratamento com FA também com pepino (Politycka 1998), e com soja (Santos *et al.*, 2004). Ao contrário, no presente trabalho o gene *PAL* foi alterado em alguns tecidos após tratamento com FA, reduzindo a sua expressão, porém nenhuma atividade enzimática foi avaliada, sendo necessárias avaliações deste tipo para tornar os dados de expressão mais robustos.

Em relação ao efeito do PIP nas plantas de arroz, observamos novamente que nenhuma variável de crescimento analisada foi alterada. Porém, ao contrário do tratamento com ácido ferúlico, as plantas tratadas com PIP tiveram seu teor de lignina modificados diferentemente entre os tecidos. Somente os tecidos de folha dreno e fonte e de raízes foram modificadas. As folhas dreno tiveram um aumento de aproximadamente 14 % no teor de lignina das plantas tipo selvagens, enquanto que no mutante 8528 foi observado uma diminuição de 24 % no teor de lignina em folhas não jovens, folhas fonte. Nos tecidos de raiz houve uma diminuição de 22,5 % no teor de lignina nas plantas WT, e nos mutantes não foram observadas diferenças. Os dados de folha fonte e raiz correspondem com a literatura, onde a aplicação de PIP promove a diminuição dos teores de lignina, como em soja (Santos *et al.*, 2008; Salvador, 2013; Siscar, 2009).

As plantas que apresentaram uma diminuição no teor de lignina, também apresentaram uma diminuição na expressão de alguns genes. Como o PIP é um efetivo inibidor da enzima *C4H* (Schoch *et al.*, 2002), uma das primeiras enzimas da rota, a adição do PIP ao meio hidropônico, pode ter inibido a enzima *C4H*, diminuindo a expressão das enzimas subsequentes, resultando em um menor teor de lignina no final.

Porém, os efeitos contrastantes do PIP em diferentes tecidos, mesmo em plantas controle, sugerem que esta substância possa também afetar outras enzimas citocromo P450,

produzindo efeitos pleiotrópicos complexos. Em tecidos que não foram encontradas variações na quantidade de lignina, os genes da rota da lignina analisados foram alterados de alguma forma, aumentando ou diminuindo sua expressão. Como é o caso da bainha, que mesmo não sendo observadas variações no teor de lignina, seus genes tiveram sua expressão modificada.

Em folhas, resultados semelhantes ao FA foram observados em plantas WT, a adição de PIP reduziu a expressão de todos os genes analisados. Mas, em contraste, neste órgão o PIP aumentou a expressão do gene *CAD2* no mutante 7776 e de *COMT* no mutante 8528, ao passo que não afetou a expressão dos genes *4CL* e *PAL*. Desta forma, PIP tem um efeito diferente do que FA nos mutantes. Em bainhas, podemos ver, como observado em folhas, um forte efeito inibidor do PIP em plantas WT para 3 dos genes (*CAD2*, *COMT* e *PAL*), ao passo que observamos um efeito indutor da expressão do gene *COMT* para o mutante 7776, em contraste com a redução. Outro contraste entre os mutantes é observado para o gene *PAL*, o PIP reduz a expressão somente no mutante 8528. Já em raiz, somente houve alterações na expressão das plantas tipo selvagem, os mutantes não alteraram sua expressão após tratamento com PIP.

Analisando os efeitos do PIP e FA em conjunto, observamos que os efeitos diferem quanto ao órgão, e também entre os mutantes. Uma explicação para estes efeitos complexos seria a de que a exposição das plantas a estes compostos foi longa demais, perturbando a homeostase do metabolismo dos fenilpropanóides, e provavelmente da lignina. Por sua vez, as alterações nestas rotas pode ter modificado a absorção de água e condutância hidráulica do xilema, resultando em efeitos pleiotrópicos diversos. Nossa hipótese sugere que caracterização de fenótipos a serem descobertos quando da perturbação desta homeostase sejam feitas em períodos menores, como um ou dois dias e em estádios iniciais de desenvolvimento, como discutido anteriormente.

Outra hipótese a ser testada a partir dos resultados descritos nesse trabalho, é de que como não foi possível analisar grandes diferenças significativas nos teores de lignina em todos os tecidos, talvez esse gene esteja relacionado a suberina. A suberina tem sua formação similar a lignina, ela possui seus monômeros formados de ácido ferúlico, glicerol e ácidos graxos (Franke & Schreiber, 2007). E já se é conhecido que esses monômeros são transportados por alguns tipos de transportadores ABC (Fleck *et al.*, 2011). Porém, trabalhos posteriores serão necessários para tentar analisar a relação desse transportador com a suberina, e validar essa última hipótese.

### 5.3 Efeito do estresse osmótico

Efeitos posteriores nesses mutantes foram observados no trabalho de Anne Sophie, quando submetidos a seca, onde encontraram uma maior sensibilidade nesses mutantes. Além disso, analisaram que no promotor do gene *OsABCB17* são encontrados três elementos identificados como específicos para a resposta a seca (Cooper *et al.*, 2003), sendo mais uma evidência de que ele pode estar envolvido na recuperação do estresse. Desta forma, no presente trabalho foram testados esses mutantes sob estresse osmótico para contribuir na determinação da relação desse gene com o déficit de água. Após sete dias de estresse osmótico, podemos observar que as plantas mutantes foram mais sensíveis ao estresse osmótico, apresentando uma maior desidratação (menor teor relativo de água). A severidade desta maior desidratação pode ser deduzida quando se observa o fato de que em apenas 7 dias, esta desidratação já resultou em menor redução na produção de biomassa das plantas mutantes. Este fenótipo poderia ser explicado por uma maior transpiração, ou uma menor capacidade de absorção e/ou condutividade hidráulica do xilema. Entretanto, os mutantes não diferem do controle em sua transpiração. Desta forma, nossa hipótese seria de que a menor absorção e/ou condutividade hidráulica do xilema das plantas mutantes, resultou em um maior desequilíbrio. Podendo esse fato também estar ligado a suberina, que tem um importante papel na absorção de água e na condutividade do xilema. Ela cria uma barreira hidrofóbica impedindo o movimento de água do cilindro vascular de volta ao córtex radicular. Este impedimento, associado com a absorção de nutrientes e sua concentração no cilindro vascular das raízes, tem grande importância para o efeito osmótico que é uma força motriz de absorção de água do solo (Taiz & Zeiger, 2004). Outra importante contribuição da suberina é seu papel fundamental na composição da cutina, a qual cria uma camada cerosa na superfície das folhas, impedindo a perda de água diretamente pelas células epidérmicas de todos os órgãos da planta. Hipotetizamos que no mutante *ABCB17* teríamos menos suberina e menos cutícula, contribuindo para que a planta perca mais água, diretamente das células epidérmicas. Porém estudos precisam ser feitos para comprovar se ambos os efeitos existem nestas plantas mutantes.

## 6 - CONCLUSÃO

Podemos concluir que o gene *ABCB17* pode estar ligado ao transporte de ferulato, porém a falta desse transportador não gerou grandes alterações no teor de lignina, como esperado, mostrando que o gene na verdade pode estar envolvido em outra via, como a via da suberina. Evidência também encontrada quando analisamos os efeitos positivos observados no crescimento da parte aérea e radicular, que provavelmente são devidos a redução da alocação do carbono na síntese de suberina, com o aumento da disponibilidade de energia para o crescimento e para a maior acumulação de lignina em alguns órgãos. Entretanto, a falta do gene gerou efeitos negativos, tornando as plantas mais sensíveis ao estresse osmótico, provavelmente devido a uma desidratação resultante da redução da acumulação da suberina e cutícula nas células epidérmicas e subepidérmicas, ou através da redução da absorção de água e/ou da condutividade do xilema. Porém, estudos adicionais precisam ser feitos no intuito de obter evidências diretas para fundamentar as hipóteses levantadas nesse trabalho.

## 7 - REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ALEJANDRO, S.; LEE, Y.; TOHGE, T.; SUDRE, D.; OSORIO, S.; PARK, J.; BOVET, L.; LEE, Y.; GELDNER, N.; FERNIE, A.R.; MARTINOIA, E. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. **Current Biology**, v.22 , p.1207–1212, 2012.

BAUCHER M, MONTIES B, VAN MONTAGU M, BOERJAN W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p.125–197, 1998.

BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PI- LATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M. T.; PETIT-CONIL, M.; CORNU, D.; MONTIES, B.; VAN MON- TAGU, M.; INZ, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulation a cynammil alcohol dehydrogenase in Poplar. **Plant Physiology**, v.112, p.1479- 1490, 1996.

BOERJAN W.; RALPH J.; BAUCHER M. Lignin biosynthesis. **Annual Reviews Plant Biology**, v.54, p.519–546, 2003.

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

BOYCE C. K.; ZWIENIECKI M. A.; CODY G. D.; JACOBSEN C.; WIRICK S.; KNOLL A. H.; HOLBROOK N. M. Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.17555–17558, 2003.

BUBNA G. A. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.1627-1633, 2011.

CAMPBELL M. M.; SEDEROFF R. R. Variation in lignin content and composition-mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. **Plant Physiology**, v.110, p.3-13, 1996.

CARPITA, N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.47, p.445-476, 1996.

CHENG H.; LI L.; XU F.; CHENG S.; CAO F.; WANG Y.; YUAN H.; JIANG D.; WU C. Expression patterns of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene involved in lignin biosynthesis and environmental stress in *Ginkgo biloba*. **Molecular Biology Reports**, v.40, p.707–721, 2013.

CHENG HUA, LI LINLING, CHENG SHUIYUAN, CAO FULIANG, XU FENG, WANG YAN, JIANG DEZHI, YUAN HONGHUI, WU CONGHUA. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene in *Ginkgo biloba* : Effects on lignification and environmental stresses. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.26, p.6780 -6794, 11 Março, 2012.

CHO, M.; LEE, S. H.; CHO, H. T. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. **Plant Cell**, v.19, p.3930–3943, 2007.

COLEMAN H. D.; Park J. Y.; Nair R.; Chapple C.; Mansfield S. D. RNAi-mediated suppression of *p*-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.4501–4506, 2008.

COSTA M. A.; COLLINS R. E.; ANTEROLA A. M.; COCHRANE F. C.; DAVIN L. B.; LEWIS N. G. An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. **Phytochemistry**, v.64, p.1097–1112, 2003.

DELLAPORTA S. L.; WOOD J.; HICKS J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reports**, v.1, p.19–21, 1983.

DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, p.1230–1241, 2008.

DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; FINGER, A.; TEIXEIRA, A. C. N.; FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.1199–1208, 2004.

EINHELLIG F. A. Allelopathy: Current status and future goals. *Allelopathy, Organisms, Processes and Applications*, ACS Symposium Series 582, American Chemical Society, Washington, DC, p 1-24, 1995.

EHLTING J.; BÜTTNER D.; WANG Q.; DOUGLAS C. J.; SOMSSICH I. E.; KOMBRINK E. Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. **Plant Journal**, v.19, n.9–20, 1999.

EHLTING J.; DOUGLAS, C. Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene family, **Plant Physiol**, v.112, p.193–205, 1996.

EHLTING J.; MATTHEUS N.; AESCHLIMAN D. S.; LI E.; HAMBERGER B.; CULLIS I. F.; ZHUANG J.; KANEDA M.; MANSFIELD S. D.; SAMUELS L.; RITLAND K.; ELLIS B. E.; BOHLMANN J.; DOUGLAS C. J. Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. **The Plant Journal**, v.42, p.618–640, 2005.

FERRER J. L.; ZUBIETA C.; DIXON R. A.; NOEL J. P. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme a 3-O-methyltransferase. **Plant Physiology**, v.137, p.1009–1017, 2005.

FLECK A. T.; NYE T.; REPENNING C.; STAHL F.; ZAHN M.; SCHENK M. K. Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.2001-2011, 2011.

FRANKE R.; SCHREIBER L. Suberin – a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.252–259, 2007.

FOSTER, C. E.; MARTIN T. M.; PAULY, M. Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (lignocellulosic biomass – Part I: Lignin. **Jove – Journal of Visualized Experiments**, 2010.

GARCIA O.; BOUIGE P.; FORESTIER C.; DASSA E. Inventory and comparative analysis of rice and Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) systems. **Journal Molecular Biology**, v.343, p.249–265, 2004.

GEISLER M.; MURPHY A. S. The ABC of auxin transport: the role of P-glycoproteins in plant development. **FEBS Letters**, v.580, p.1094–1102, 2006.

GRECO R.; PIETER B. F.; OUWERKERK C. S.; AJAY K.; LUCIA C.; PERE P.; EMMANUEM G. Transposon Insertional Mutagenesis in Rice. **Plant Physiology**, v.125, n.3, p.1175-1177, 2001.

GÓMEZ ROS LV.; GABALDÓN C.; POMAR F.; MERINO F.; PEDREÑO M. A.; BARCELÓ A. R. Structural motifs of syringyl peroxidases predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheo-phytes. **New Phytologist**, v.173, p.63–78, 2007.

GOUJON T.; SIBOUT R.; POLLET B.; MABA B.; NUSSAUME L.; BECHTOLD N.; LU F.; RALPH J.; MILA I.; BARRIÈRE Y.; LAPIERRE C.; JOUANIN L. A new Arabidopsis thaliana mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. **Plant Molecular Biology**, v.51, p.973–989, 2003.

GUI J.; SHEN J.; LI L. Functional Characterization of Evolutionarily Divergent 4-Coumarate: Coenzyme A Ligases in Rice. **Plant Physiology**, v.157, n.2, p.574-586, October 2011.

GUO D.M.; RAN J. H.; WANG X. Q. Evolution of the Cinnamyl/Sinapyl Alcohol Dehydrogenase (CAD/SAD) gene family: The emergence of real lignin is associated with the origin of bona fide CAD. **Journal Molecular Evolution**, v.71, p.202–218, 2010.

HALPIN C.; HOLT K.; CHOJECKI J.; OLIVER D.; CHABBERT B.; MONTIES B.; EDWARDS K.; BARAKATE A.; FOXON G. A. Brown-midrib maize (bm1): a mutation affecting the Cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. **Plant Journal**, v.14, p.545-553, 1998.

HALPIN, C.; KNIGHT, M. E.; FOXON, G. A.; CAMPBELL, M. M.; BOUDET, A. M.; BOON, J. J.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; SCHUCH, W. Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. **The Plant Journal**, v.6, p.339-350, 1994.

HAMBERGER B.; HAHLBROCK K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in Arabidopsis thaliana comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.2209–2214, 2004.

HARDING S. A.; LESHKEVICH J.; CHIANG V. L.; TSAI C. J. Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. **Plant Physiol**, v.128, p.428–438, 2002.

HEATH R.; MCINNES R.; LIDGETT A.; HUXLEY H.; LYNCH D.; JONES E.; MAHONEY N.; SPANGENBERG G. Isolation and characterisation of three 4-coumarate : CoA-ligase homologue cDNAs from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Plant Physiol**, v.159, p.773–779, 2002.

HIBINO, T.; TAKABE, K.; KAWA-ZU, T.; SHIBATA, D.; HIGUCHI, T. Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.5, p.929- 931, 1995.

HIGUCHI T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v.52, p.2–8, 2006.

HIRANO, K.; AYA, K.; KONDO, M.; OKUNO, A.; MORINAKA, Y.; MATSUOKA, M. OsCAD2 is the major CAD gene responsible for monolignol biosynthesis in rice culm. **Plant Cell Reports**, v.31, p.91–101, 2012.

HIROHIKO H. Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.118-122, 2001.

HU W. J.; KAWAOKA A.; TSAI C. J.; LUNG J.; OSAKABE K.; EBINUMA H.; CHIANG V. L. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.5407–5412.

HUMPHREYS, J. M; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion Plant Biology**, v.5, p.224–229, 2002.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; STONE, B. A. Phenolic-acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. **Phytochemistry**, v.29, p.733–737, 1990.

JAIN M.; NIJHAWAN A.; TYAGI A. K.; KHURANA J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.30, p.646-51, 2006.

KNOBLOCH K. H.; HAHLBROCK K. 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm, Arch. **Biochemical Biophysical**, v.184, p.237–248, 1977.

KANEDA M.; RENSING K. H.; WONG J. C.; BANNO B.; MANSFIELD S. D.; SAMUELS A. L. Tracking monolignols during wood development in lodgepole pine. **Plant Physiology**, v.147, p.1750-1760, 2008.

KANEDA M.; SCHUETZ M.; LIN B. S.; CHANIS C.; HAMBERGER B.; WESTERN T. L.; EHLTING J.; SAMUELS A. L. ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.2063–2077, 2011.

- KIM, S. J.; KIM, K.W.; CHO, M. H.; FRANCESCHI, V. R.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Expression of cinnamyl alcohol dehydrogenases and their putative homologues during *Arabidopsis thaliana* growth and development: Lessons for database annotations? **Phytochemistry**, v.68, p.1957-1974, 2007.
- KIM, D. Y.; BOVET, L.; MAESHIMA, M.; MARTINOIA, E.; LEE, Y. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. **Plant Journal**, v.50, p.207–218, 2007.
- KUBASEK W. J.; SHIRLEY B. W.; MCKILLOP A.; GOODMAN H. M.; BRIGGS W.; AUSUBEL F. M. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating arabidopsis seedlings. **Plant Cell**, v.4, p.1229–1236, 1992.
- LAM, T. B. T.; KADOYA, K.; IYAMA, K. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the  $\beta$ - position, in grass cell walls. **Phytochemistry**, v.57, p.987–992, 2001.
- LARSEN, P. B.; GEISLER, M. J.; JONES, C. A.; WILLIAMS, K. M.; CANCEL, J. D. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v.41, p.353–363, 2005.
- LI, L.; CHENG, X.; LESHKEVICH, J.; UMEZAWA, T.; HARDING, S. CHIANG, V. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. **Plant Cell**, v.13, p.1567–1585, 2001.
- LI X.; YANG Y.; YAO J.; CHEN G.; LI X.; ZHANG Q.; WU X. FLEXIBLE CULM 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. **Plant Molecular Biology**, v.69, p.685–697, 2009.
- LINDERMAYR C.; MOLLERS B.; FLIEGMANN J.; UHLMANN A.; LOTTSPREICH F. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. **European Journal Biochemistry**, v.269, p.1304–1315, 2002.
- LOZOYA, E.; HOFFMAN, H.; DOUGLAS, C.; SCHULZ, W.; SCHEEL, D.; HAHLBROCK, K. Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate : CoA ligase genes in parsley. **European Journal Biochemistry**, v.176, p.661–667, 1988.
- MA QING-HU, XU YANG. Characterization of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis. **Biochimie**, v.90, p.515-524, 2008.
- MARTONE P. T.; ESTEVEZ J. M.; LU F.; RUEL K.; DENNY M. W.; SOMERVILLE C.; RALPH J. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. **Current Biology**, v.19, p. 169–175, 2009.
- MIR DERIKVAND M.; SIERRA J. B.; RUEL K.; POLLET B.; DO C. T.; THEVENIN J.; BUFFARD D.; JOUANIN L.; LAPIERRE C. Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in *Arabidopsis* mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1. **Planta**, v.227, p.943–956, 2008.

MULTANI D. S.; BRIGGS S. P.; CHAMBERLIN M. A.; BLAKESLEE J. J.; MURPHY A. S.; JOHAL G. S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. **Science**, v.302, p.81–84, 2003.

OU, S. Y.; KWOK, K. C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.84, p.1261-1269, 2004.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Report**, v.24, p.255–265, 2005.

PATTEN A. M.; CARDENAS C. L.; COCHRANE F. C.; LASKAR D. D.; BEDGAR D. L.; DAVIN L. B.; LEWIS N. G. Reassessment of effects on lignifications and vascular development in the *irx4* Arabidopsis mutant. **Phytochemistry**, v.66, p.2092-2107, 2005.

PIQUEMAL J.; CHAMAYOU S.; NADAUD I.; BECKERT M.; BARRIÈRE Y.; MILA I.; LAPIERRE C.; RIGAU J.; PUIGDOMENECH P.; JAUNEAU A.; DIGONNET C.; BOUDET A. M.; GOFFNER D.; PICHON M. Down-regulation of caffeic acid o-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. **Plant Physiology**, v.130, p.1675–1685, 2002.

POLITYCKA, B. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase phenol. **Acta Physiologiae plantarum**, v.20, p.405-410, 1998.

QUENTIN M.; ALLASIA V.; PEGARD A.; ALLAIS F.; DUCROT P. H.; FAVERY B.; LEVIS C.; MARTINET S.; MASUR C.; PONCHET M. Imbalanced lignin biosynthesis promotes the sexual reproduction of homothallic oomycete pathogens. **PLoS Pathog**, v.5, n.1, 2009.

RAES J.; ROHDE A.; CHRISTENSEN J. H.; VAN DE PEER Y.; BOERJAN W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.133, p.1051-1071, 2003.

REA P. A. Plant ATP-binding cassette transporters. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.347–375, 2007.

RODRIGUES, B. N.; PASSINI, T.; FERREIRA, A. G. Research on allelopathy in Brazil. Allelopathy update. **Science Publication**. p 307-323, 1999.

SALVADOR V. H.; LIMA R. B.; DOS SANTOS W. D.; SOARES A. R.; BÖHM P. A. F.; MARCHIOSI R.; FERRARESE M. L. L. Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. **PLoS ONE**, v.8, n.7, p. 2-10, July 2013.

SAMUELS A. L.; RENSING K. H.; DOUGLAS C. J.; MANSFIELD S. D.; DHARMAWARDHANA D. P.; ELLIS B. E. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. **Planta**, v.216, p.72-82, 2002.

SANCHEZ-FERNANDEZ R.; EMYR DAVIES T. G.; The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.30231–30244, 2001.

SÁNCHEZ, M.; PEÑA, M. J.; REVILLA, G.; ZARRA, I.; Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. **Plant Physiology**, v.111, p.941–946, 1996.

SATO T.; KIUCHI F.; SANKAWA U. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. **Phytochemistry**, v.21, p.845-950, 1982.

SCHOCH G. A.; NIKOV G. N.; ALWORTH W. L.; WERCK-REICHHART D. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. **Plant Physiology**, v.130, n.2, p.1022-1031, 2002.

SEWALT V. J. H.; NI W.; BLOUNT J. W.; JUNG H. C.; MASOUD S. A.; HOWLE P. A.; LAMB C.; DIXON R. A. Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase or Cinnamate 4-Hydroxylase. **Plant Physiology**, v.115, p.41-50, 1997.

SEWALT V. J. H.; NI W.; JUNG H.; DIXON R. A. Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tubucum*) stems reduced in lignin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1977-1983, 1997.

SHANN, J.R.; BLUM, U.; The utilization of exogenously supplied ferulic acid in lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, v.26, p 2977-2981, 1987.

SHITAN N.; BAZIN I.; DAN K.; OBATA K.; KIGAWA K.; UEDA K.; SATO F.; FORESTIER C.; YAZAKI K. Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.751–756, 2003.

SIBOUT R.; EUDES A.; POLLET B.; GOUJON T.; MILA I.; GRANIER F.; SÉGUIN A.; LAPIERRE C.; JOUANIN L. Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in Arabidopsis. Isolation and characterization of the corresponding mutants. **Plant Physiology**, v.132, p.848–860, 2003.

SIBOUT R.; HOFTE H. Plant cell biology: the ABC of monolignol transport. **Current Biology**, v.22, p.R533–R535, 2012.

SILBER, M. V.; MEIMBERG, H.; EBEL, J. Identification of a 4-coumarate:CoA ligase gene family in the moss, *Physcomitrella patens*. **Phytochemistry**, v. 69, p.2449–2456, 2008.

SIQUEIRA J. O.; NAIR M. G.; HAMMERSCHMIDT R.; SAFIR G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Reviews in Plant Science**, v.10, p.63-121, 1991.

SMITH B. G.; HARRIS P.J. Ferulic acid is esterified to glucurono arabinoxylans in pineapple cell walls. **Phytochemistry**, v.56, p.513-519, 2000.

SLAVICK, B. *Methods of Studying Plant Water Relations*. Springer-Verlag, New York. 1979.

SUN H.; LI Y.; FENGA S.; ZOUA W.; GUOA K.; FANA C.; SI S.; PENG L. Analysis of five rice 4-coumarate:coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.430, p.1151–1156, 2013.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Editora Artmed, 2004.719p.

TENNANT, D.A. Test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, Oxford, v.63, n.3, p.995-1001, 1975.

TRONCHET M.; BALAGUE C.; KROJ T.; JOUANIN L.; ROBY D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.83–92, 2010.

VERRIER P. J.; BIRD D.; BURLA B.; DASSA E.; FORESTIER C.; GEISLER M.; KLEIN M.; KOLUKISAAGLU U.; LEE Y.; MARTINOIA E.; MURPHY A.; REA P. A.; SAMUELS L.; SCHULZ B.; SPALDING E. J.; YAZAKI K.; THEODOULOU F. L. Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. **Trends in Plant Science**, v.13, p.151–159, 2008.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion Plant Biology**, v.7, p.472–479, 2004.

XU Z.; ZHANG D.; HU J.; ZHOU X.; YE X.; REICHEL K. L.; STEWART N. R.; SYRENNE R. D.; YANG X.; GAO P. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC Bioinformatics**, v.10, 2009.

YE Z.; ZHONG R.; MORRISON W. H.; HIMMELSBACH D. S. Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase and lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, v.57, p.1177-1185, 2001.

YUAN J. S.; WANG D.; STEWART C. N. JR. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. **Biotechnology Journal**, v.3, n.1, p.112 – 123, 2008.

ZANARDO D. I. L.; LIMA R. B.; FERRARESE M. L. L.; BUBNA G. A.; FERRARESE-FILHO O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p.25–30, 2009.

ZHANG K.; QIAN Q.; HUANG Z.; WANG Y.; LI M.; HONG L. GOLD HULL AND INTERNODE2 encodes a primarily multifunctional cinnamyl-alcohol dehydrogenase in rice. **Plant Physiology**, v.140, p.972-983, 2006.

ZHAO S. J.; HU Z. B.; LIU D.; LEUNG F. C. Two divergent members of 4-coumarate:coenzyme A ligase from *Salvia miltiorrhiza* Bunge: cDNA cloning and functional study, *J. Integr. Plant Biology*, v.48, p.1355–1364, 2006.

ZUBIETA C.; KOTA P.; FERRER J-L.; DIXON R. A.; NOEL J. P. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. **Plant Cell**, v.14, p.1265–1277, 2002.