

TALITA CRISTINA MAMEDES

**Brachypodium distachyon (L.) P. BEAUV.: CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA
E ESTABILIDADE GENÉTICA DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
MODULAÇÃO DA PAREDE CELULAR PELA LUZ**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

Mamedes, Talita Cristina, 1989-

M264b
2017

Brachypodium distachyon (L.) P. BEAUV. : caracterização metabólica e estabilidade genética durante a embriogênese somática e modulação da parede celular pela luz / Talita Cristina Mamedes. – Viçosa, MG, 2017.

ix, 73f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Brachypodium distachyon* - Morfogênese. 2. Gramínea. 3. Plantas - Metabolismo. 4. Embriogênese somática. 5. Tecidos vegetais - Culturas e meio de culturas. 6. Plantas - Meios de cultivo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 584.9

TALITA CRISTINA MAMEDES

***Brachypodium distachyon* (L.) P. BEAUV.: CARACTERIZAÇÃO
METABÓLICA E ESTABILIDADE GENÉTICA DURANTE A
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E MODULAÇÃO DA PAREDE
CELULAR PELA LUZ**

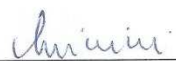
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

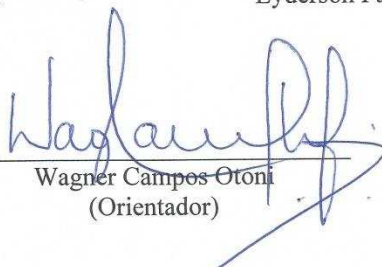
APROVADA: 28 de março de 2017.


Adriano Nunes Nesi


Alice Rita Barbosa


Diego Silva Batista


Lyderson Facio Viccini


Wagner Campos Otoni
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo constante cuidado e provisão.

Agradeço ao meu marido, Marcos, pelo apoio, amor e ajuda em tudo que preciso.

Aos meus pais, Fátima e Ramão, e minha irmã, por todo o amor e orações.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela infraestrutura e valiosa oportunidade de crescimento profissional.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Wagner Otoni pelo incentivo e confiança depositada em minha capacidade como profissional e força em momentos de dificuldade na pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II. Ao Diego Silva Batista, pela ajuda nas análises moleculares e estatísticas, à Ana Cláudia Ferreira da Cruz, pela enorme colaboração nas análises anatômicas; ao Evandro Fortini e Kristhiano Chagas, pela disposição em sempre ajudar; e a todos os amigos do laboratório, sempre animados para o trabalho ou à hora do café.

A todos os funcionários, professores e colegas que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e profissional e a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

TALITA CRISTINA MAMEDES, filha de Maria de Fátima Mota Mamedes e Ramão Mamedes, nasceu em 29 de julho de 1989, na cidade de Pimenta Bueno, estado de Rondônia.

Graduou-se em Engenharia Florestal em dezembro de 2010 pela Universidade Estadual de Goiás. Iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal em março de 2011 na Universidade Federal de Goiás, tendo defendido dissertação em abril de 2013. Iniciou o doutorado em Fisiologia Vegetal em julho de 2013 na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em março de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 1	11
Potencial regenerativo, perfil metabólico e estabilidade genética durante sucessivos subcultivos de calos embriogênicos de <i>Brachypodium distachyon</i>	11
RESUMO	11
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
Material vegetal	16
Produção de calos embriogênicos (CE)	16
Avaliação de idades de calos embriogênicos (CE) e regeneração de plantas	17
Análises de metabólitos	17
Citometria de fluxo	18
Análises estatísticas	18
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2	40
Qualidade de luz afeta os teores de lignina e celulose, a expressão de genes de suas rotas de síntese e mecanismos de defesa antioxidativo em <i>Brachypodium distachyon</i>	40
RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42

MATERIAL E MÉTODOS	45
Material vegetal	45
Efeito da qualidade de luz	45
Análises histoquímicas	46
Extração de RNA, síntese de cDNA e análise em RT-qPCR	47
Atividade de enzimas antioxidativas	49
Análises da composição da parede celular	49
Isolamento da parede celular	49
Lignina.....	50
Celulose	50
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	61
CONCLUSÃO	68
DADOS SUPLEMENTARES	69

RESUMO

MAMEDES, Talita Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017.
Brachypodium distachyon (L.) P. Beauv.: embriogênese somática, desenvolvimento e modulação da parede celular durante o cultivo em diferentes qualidades de luz.
Orientador: Wagner Campos Otoni.

Brachypodium distachyon tem sido utilizado como espécie modelo para gramíneas de forma bem sucedida. Nesse sentido, objetivou-se avaliar sucessivos subcultivos de calos embriogênicos até a formação de embriões somáticos, analisando-se caracteres morfo-fisiológicos, o perfil metabólico e a estabilidade genética das plantas obtidas, bem como o efeito da qualidade da luz na morfogênese e modulação dos componentes da parede celular, anatomia, enzimas do sistema antioxidativo e expressão de genes da rota lignocelulósica. No primeiro experimento, embriões imaturos foram cultivados *in vitro* em meio contendo 2,4-D para indução de calos. Calos embriogênicos (CE) foram coletados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 360 dias de idade e calos não embriogênicos (CNE), aos 30 dias. Após as transferências para meio de indução foram coletadas estruturas embriogênicas (EE) oriundas de 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias, em meio contendo cinetina. Com base nos dados morfo-fisiológicos por meio de discriminantes canônicas as idades 60 e 90 dias são as mais indicadas para o uso, devido à capacidade regenerativa e formação de EE. O perfil metabólico de CE mostrou a separação de dois grupos de 30 aos 240 e 360 dias por meio da análise de componentes principais (PCA). A maioria dos metabólitos sofreu queda drástica dos teores relativos de metabólitos aos 360 dias. Os metabólitos ácido malônico, triptofano, asparagina e eritrose os quais foram importantes para discriminar os grupos. Com a análise univariada (Teste t) foi possível destacar quais metabólitos reduziram em CNE como os aminoácidos ácido aspártico, asparagina, triptofano e glicina, sugerindo serem indispensáveis para a competência embriogênica em *B. distachyon*. O status metabólico de EE permitiu a separação em três grupos: 60, 90 e 120 a 240 dias. Os metabólitos-chave para distinguir entre os grupos de EE foram o galactinol, o oxaloacetato, o triptofano e a valina. A estabilidade genética das plantas regeneradas foi avaliada por citometria de fluxo, mostrou que não houve relação da instabilidade da ploidia em plantas regeneradas de calos de *B. distachyon* com a idade dos calos. Conclui-se que a perda da capacidade regenerativa de CE em *B. distachyon* ocorre a partir de 120 dias, mostrando que o uso de CE pode ser estendido para 90 dias de cultivo. No segundo

experimento, os tratamentos foram constituídos por três qualidades de luz: lâmpadas fluorescentes (LF), LED Branca e LED azul (A)/vermelho (V) de mesma irradiância. Após 40 dias as qualidades de luz influenciaram a morfo-fisiologia, deposição de lignina, alterações no sistema de enzimas antioxidantes e expressão de genes envolvidos na rota lignocelulósica de plantas *in vitro* de *B. distachyon*. As LFs, de uso tradicional em salas de crescimento, promoveram maiores taxas de crescimento, forte deposição de lignina, maiores quantidades de celulose corroborando com as maiores expressões dos genes CESa4 e CESa7. Os genes PAL1 e F5H1 tiveram seus níveis de expressão em plantas aumentados quando submetidas à LED A/V em comparação com as crescidas sob LFs ou LED Branca, enquanto que os demais genes analisados não variaram os níveis de expressão entre os tratamentos. O gene CESa4 teve sua expressão reduzida sob LED A/V, sendo que nessa qualidade espectral houveram plantas menores, com aumento no teor de lignina total e maior deposição de lignina G em relação à lignina S e baixa quantidade de celulose total, comparativamente aos demais tratamentos. No tratamento LED Branca, ambos CESa4 e CESa7 apresentaram expressão reduzida em relação à LF, além do aumento significativo nas atividades das enzimas SOD e CAT demonstrando ser importantes mecanismos de defesa antioxidativo induzido por LED Branca. Conclui-se que a qualidade espectral das lâmpadas LEDs alterou os teores de lignina e celulose e a expressão de genes de suas rotas de síntese, além de terem sido observadas alterações anatômicas e em mecanismos de defesa antioxidativa em *B. distachyon*. Em conjunto, esses dados sugerem que a regulação dos padrões de deposição de parede celular e lignificação são afetadas pelos espectros da luz e sua remodelação pode ser feita de acordo com qualidade de luz.

ABSTRACT

MAMEDES, Talita Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Brachypodium distachyon (L.) P. Beauv.: Somatic embryogenesis, development and modulation of cell wall during cultivation under different light qualities.** Adviser: Wagner Campos Otoni.

Brachypodium distachyon has been successfully used as a model species for grasses. Here we performed successive subcultures of embryogenic calli until the formation of embryos, assessing the morphological and physiological characteristics, metabolic profile and genetic stability of the plants obtained, as well as the effect of light quality on morphogenesis and modulation of the cell wall components, anatomy, antioxidative enzyme systems and expression of lignocellulosic route related genes. In the first experiment, immature embryos were cultured in vitro in 2,4-D-containing medium for callus induction. Embryogenic callus (EC) were collected at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 360 days and non-embryogenic callus (NEC) at 30 days. After the transfer the induction medium, embryogenic structures (ES) from 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 days were collected in Kinetin-containing medium. Based on the morphological and physiological data, the ages of 60 and 90 days were the most suitable for use due to its greater regenerative capacity and formation of ES, as revealed by Canonical discriminant analysis. The EC metabolic profile separated two groups based on callus age: one from 30 to 240 and another in 360 days using Principal Component Analysis (PCA). Most metabolites suffered a drastic decrease in their levels at 360 days. The metabolites malonic acid, tryptophan, asparagine and erythrose were important to discriminate the groups. The univariate analysis (t test) highlighted which metabolites decreased in NEC such as amino acids aspartic acid, asparagine, tryptophan and glycine, suggesting their essentiality for the embryogenic competence acquisition in *B. distachyon*. The metabolic status of EC allowed to separate three groups: 60, 90 and 120 to 240 days long using PCA. The key-metabolites used to distinguish ES groups were galactinol, oxaloacetate, tryptophan and valine. The genetic stability of the regenerated plants was evaluated by flow cytometry, which showed that there was no relation between ploidy instability and callus age in regenerated plants of *B. distachyon*. It is concluded that the loss of EC regenerative capacity in *B. distachyon* occurs from 120 days, showing that the use of EC can be extended to 90 days of cultivation. In the second experiment, the treatments were composed of three light qualities: fluorescent lamps (FL), white LED and blue/red (B/R) LED under the same irradiance. After 40

days the light qualities influenced morpho-physiology, lignin deposition, changes in the antioxidant enzyme system and expression of genes involved in the lignocellulosic route of *B. distachyon* in vitro plants. In FL, traditionally used in growth rooms, higher growth rates, strong deposition of lignin, higher amounts of cellulose were promoted, corroborating with the higher expressions of the CESa4 and CESa7 genes. The PAL1 and F5H1 genes had their expression levels increased in plants subjected to B/R LEDs compared to those grown under FLs or White LED, while the other genes analyzed did not vary their expression levels among the treatments. The CESa4 gene had reduced expression under B/R LEDs, being this spectral quality showed smaller plants, with an increase in the total lignin content, higher deposition of G lignin in relation to the S lignin and lower amount of total cellulose, compared to the other treatments. In the White LED treatment, both CESa4 and CESa7 had reduced expression in relation to FL, in addition to the significant increase in the activities of SOD and CAT enzymes, demonstrating to be important mechanisms of antioxidative defense induced by white LED. It is conclude that the LED lamps spectral quality altered the lignin and cellulose contents and the expression of the genes related to their byosynthetic routes, besides the anatomical alterations and antioxidative defense mechanisms were observed in *B. distachyon*. Taken together, these data suggest that the regulation of cell wall deposition patterns and lignification are affected by the spectral light and its remodeling can be done according to light quality.

INTRODUÇÃO

As plantas da família Poaceae, popularmente conhecidas como gramíneas têm sido muito estudadas por serem fonte de biomassa renovável (para a produção de bioenergia e biocombustíveis) e fonte de alimento (cereais e pastagens) (Brkljacic et al., 2011; Jung et al., 2013; Dong et al., 2015; Vogel, 2015). Devido à sua grande importância para a humanidade é relevante compreender sua biologia em detalhes. Todavia, essa compreensão é mais facilmente alcançada por meio do uso de plantas modelo, as quais facilitam as investigações, possibilitando avanços rápidos na biologia molecular e genética (Vogel, 2015). Sabendo da necessidade de aprofundar conhecimentos para melhorar as culturas de alimentos e produção de biomassa, *Brachypodium distachyon* foi considerado um sistema modelo para gramíneas forrageiras e cereais acessível para pesquisa (Bablak et al., 1995; Draper et al., 2001; Vogel, 2015).

A aplicação de *B. distachyon* como planta modelo deve-se ao fácil crescimento, pequena estatura, rápido ciclo de vida, sequenciamento completo do genoma, ocorrido em 2010 e realização de diversas análises “ômicas”. O genoma de *B. distachyon*, em comparação a outros cereais, é pequeno (272 Mb), pouco repetitivo e atua como referência para montagens de genomas de cereais complexos (Mur et al., 2011; Kellogg, 2015; Vogel, 2015). Acessos silvestres e linhagens de *Brachypodium* podem ser acessados a partir do Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal (USDA) (<http://www.ars.usda.gov/>) e coleções de mutantes foram desenvolvidas pelo Departamento de Energia dos EUA (DOE) em conjunto com o Joint Genome Institute (JGI) (<http://jgi.doe.gov/>). *B. distachyon* também possui eficientes protocolos de transformações de plantas (Vogel e Hill, 2008; Alves et al., 2009; Bragg et al., 2015). Os recursos disponíveis para *B. distachyon* aceleram ainda mais sua adoção como sistema modelo, provado pelo crescente número de distribuição de sementes e aumento do número publicações (Vogel, 2015).

A transformação mediada por *Agrobacterium* de *B. distachyon* é um modelo atraente para gramíneas, pois é estreitamente relacionada com os principais cereais e forrageiras de interesse (Alves et al., 2009). Filogeneticamente, *B. distachyon* é mais próxima ao trigo e à cevada, que possuem os maiores genomas entre as gramíneas, mas possui sintenia e alta colinearidade com vários genes de arroz. Cerca de 80% das famílias de genes são compartilhados entre as três subfamílias de gramíneas

representadas por *B. distachyon*, arroz e sorgo (IBI, 2010; Kellogg, 2015). As semelhanças no conteúdo e estrutura da família de genes entre as espécies de *B. distachyon* reforçam seu destaque como um modelo de genômica funcional para todas as gramíneas. Seu genoma inclui cerca de 25000 genes, um número comparável a de outros genomas de gramíneas (JGI, 2017) e destes, aproximadamente 1400 genes parecem ser específicos de gramíneas, compartilhados com arroz e sorgo, mas não com eudicotiledôneas (Kellogg, 2015).

Há cerca de duas décadas, Bablak et al. (1995) destacaram *B. distachyon* como planta modelo para gramíneas, relatando condições do cultivo *in vitro* e a necessidade de um sistema de transformação como um pré-requisito para qualquer sistema de modelo. A transformação de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é predominante usada para gerar plantas transgênicas, pois resulta em inserções simples de segmentos de DNA e expressões mais estáveis. A transformação de plantas mediada por *A. tumefaciens* utiliza da capacidade natural da bactéria de transferir seu plasmídeo indutor de tumor (Ti) para o genoma do hospedeiro (Alves et al., 2009; Bragg et al., 2015).

A embriogênese somática (ES) em plantas é um processo pelo qual os embriões são gerados diretamente de células somáticas (Wickramasuriya e Dunwell, 2015), e determina o sucesso do protocolo de transformação de plantas. Neste processo de diferenciação ocorre uma sequência de alterações bioquímicas e fisiológicas induzidas por reguladores de crescimento que podem ser usados como marcadores para diferentes eventos no processo de embriogênese (Jeyaseelan e Rao 2005), assim como status metabólico durante a passagem de calo para estruturas embriogênicas (Khan et al., 2015), seguido pela regeneração da planta inteira.

Inicialmente Bablak et al. (1995) trabalharam com embriões maduros, mas a manipulação genética via transformação de plantas em *B. distachyon* se desenvolveu devido aos uso de embriões imaturos na geração de calos altamente embriogênicos com adição de 2,4-D no meio (Draper et al., 2001; Vogel et al., 2006; Pacurar et al., 2008; Vogel e Hill 2008; Alves et al., 2009). A geração desses calos embriogênicos é trabalhosa e dificultada, pois necessita de um grande número de sementes para extração e isolamento de embriões. Além disso, com o passar do tempo às culturas de calos embriogênicos perdem sua estabilidade genética, levando à redução da capacidade de regeneração das plantas e obtenção de plantas inférteis, sendo recomendados calos cultivados com no máximo 45 dias para protocolos de transformação de plantas via *A.*

tumefaciens (Alves et al., 2009). Embora não sejam totalmente conhecidos os efeitos da idade do calo no genoma de *B. distachyon*, é importante garantir a estabilidade dos genótipos selecionados (Corredoira et al., 2014). A citometria de fluxo tem sido utilizada para verificar a ploidia e estabilidade genética de plantas oriundas de sucessivos subcultivos (Fras e Maluszynska, 2004; Currais et al., 2013). Porém, não há dados na literatura que enfatizem a idade limite de utilização de calos oriundos de sucessivos subcultivos, bem como informações acerca da estabilidade genética do material em cultivo e dos fatores do metabolismo que marcam a queda da capacidade regenerativa.

B. distachyon é um sistema para o estudo de processos específicos, incluindo estudo da biologia da parede celular (Trabucco et al., 2013; Marriott et al., 2014; Rancour et al., 2015; Petrik et al., 2016), citogenética (Hasterok et al., 2015), o desenvolvimento do endosperma (Guillon et al., 2010), desenvolvimento do caule (Matos et al., 2013), inflorescência (Kellogg et al., 2013) e estresses abióticos (Jeong et al., 2013; Des Marais e Juenger, 2015).

Ainda se sabe pouco sobre as respostas de *B. distachyon* mediante a estresses. A literatura é limitada, mas é crescente o número de pesquisas sobre a fisiologia, desenvolvimento e biologia molecular da interação de *Brachypodium* com o ambiente, e os estudos moleculares e fisiológicos em sua maioria se concentram em apenas um estresse imposto. Porém *B. distachyon* é um excelente sistema modelo para abordar mecanismos de estresses combinados. Devido sua pequena estatura e ciclo de vida curto facilitando repetidas manipulações experimentais de múltiplos fatores (Des Marais e Juenger, 2015).

A luz é um fator físico que influencia todas as principais transições de desenvolvimento, como a germinação de sementes, fotomorfogênese e floração (Fankhauser e Staiger, 2002). As plantas são muito sensíveis a este fator durante todo o seu ciclo de vida. As condições de luz podem ser utilizadas para estimular vias relacionadas com metabolismo secundário em casas de vegetação (Arena et al., 2016) e in vitro (Ramakrishna e Ravishankar, 2011; Kuo et al., 2015; Ahmad et al., 2015; Wang et al., 2015; Batista et al., 2016). No cultivo in vitro, tem se alcançado resultados satisfatórios com o uso de diodos emissores de luz (LEDs) se comparado a lâmpadas fluorescentes (Poudel et al., 2008; Jung et al., 2013; Ouzounis et al., 2014; Ahmad et al., 2016). LEDs apresentam enorme potencial para melhorar o crescimento sustentável, além suprir de as necessidades de fluência e comprimento de onda das plantas e

fornecer a quantidade e qualidade de luz necessária para diferentes fases de crescimento (Fang e Jao, 2000; Darko et al., 2014).

A parede celular vegetal é uma complexa mistura de polissacarídeos e proteínas fundamentais para definir formas e funções da planta. A parede vegetal secundária além da importância funcional constitui grande porção da biomassa vegetal com alto potencial de aplicação, principalmente os componentes lignocelulósicos nos vasos do xilema e fibras, que formam uma camada estruturada entre a membrana plasmática e a parede celular primária (Didi et al., 2015). Em células com paredes secundárias aparecem a lignina, um componente frequente em tecidos como o xilema e o esclerênquima. A biossíntese da parede celular requer ação de vários compartimentos celulares com funções não totalmente esclarecidas. A celulose, por exemplo, é sintetizada na membrana plasmática, ao passo que hemiceluloses, pectinas, proteínas e glicoproteínas são sintetizadas em corpos cis e trans de Golgi e transportadas para parede celular (Oikawa et al., 2013); já a lignina é sintetizada na parede celular pela polimerização dos monolignóis catalisada por peroxidases e lacases (Fry, 2001; Wang et al., 2015).

A luz afeta a rota dos fenilpropanoides (OuYang et al., 2015; Ahmad et al., 2015) e as ligninas são derivadas a partir de múltiplos ramos das vias de biossíntese de fenilpropanoides (OuYang et al., 2015). A luz pode provocar alterações na deposição de lignina, como foi mostrado por Dong et al. (2015), em que alterações no ciclo de luz causou redução dos seus teores em trigo *in vitro*. Ainda, pode afetar outro importante componente para a modulação da parede celular vegetal: a celulose sintase - CESa (enzima com múltiplos domínios que residem na membrana plasmática ou no Golgi) é responsável pela síntese de celulose e calose (Fry, 2001). O complexo de CESa é regulado pelo fitocromo B (phyB), fotorreceptor de luz vermelha, e influencia na deposição das microfibrilas de celulose em *Arabidopsis*. No escuro as subunidades de CESa são inibidas, e o processo é revertido através da ativação de phyB invalidando a inibição (Bischoff et al., 2011).

Os mecanismos antioxidantes também são afetados pela luz (Jung et al., 2013). *Triticum aestivum* respondeu a LED Branca/vermelha aumentando a atividade de peroxidases (POD) e catalases (CAT) (Dong et al., 2015). Sob LED Azul e LED Vermelha houve o aumento de dismutases do superóxido (SOD), glutatona peroxidase (GPX), CAT e peroxidases do ascorbato (APX) em *Rehmannia glutinosa* cultivada *in vitro* (Manivannan et al., 2015). LED Vermelha aumentou as atividades de SOD, GPX,

CAT e APX de *Dianthus caryophyllus* ‘Green Beauty’ e ‘Purple Beauty’ in vitro, bem como o aumento significativo do crescimento, de parâmetros fotossintéticos e teor de nutrientes em comparação com o tratamento lâmpada fluorescente (Manivannan et al., 2017). O nível de atividade dessas enzimas reflete a situação da atividade fisiológica das plantas (Dong et al., 2015).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i) examinar a embriogênese de *B. distachyon* e o efeito da idade dos calos na estabilidade de plantas oriundas de sucessivos subcultivos e; ii) verificar os efeitos da qualidade da luz na morfogênese e modulação da parede celular.

REFERÊNCIAS

- Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2016) Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *J Photochem Photobiol B* 154: 51-56. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015.
- Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* 4(5): 638-649. doi:10.1038/nprot.2009.30
- Arena C, Tsonev T, Doneva D, Micco V, Michelozzi M, Brunetti C, Centritto M, Fineschi S, Velikova V, Loreto F (2016) The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). *Environ Exp Bot* 130:122-132. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.05.014
- Bablak P, Draper J, Davey MR, Lynch PT (1995) Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 42(1): 97-107. doi:10.1007/BF00037687
- Batista DS, Castro KM, Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 52(3): 276-282. doi:10.1007/s11627-016-9761-x
- Bischoff V, Desprez T, Mouille G, Vernhettes S, Gonneau M, Hofte H (2011) Phytochrome regulation of cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 21(21): 1822-1827. doi:10.1016/j.cub.2011.09.026.
- Bragg JN, Anderton A, Nieu R, Vogel JP (2015) *Brachypodium distachyon*. In: Wang K (ed) *Agrobacterium Protocols*. 3rd edn. Springer, New York, pp.17-33.
- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo AL, Gao C, Gu Y, Hazen SP, Holt III BF, Hong SH, Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LAJ, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, Vogel JP (2011) *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol* 157(1): 3-13. doi:10.1104/pp.111.179531
- Corredoira E, Toribio M, Vieitez AM (2014) Clonal propagation via somatic embryogenesis in *Quercus* spp. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, Ahuja MR (eds) *Tree biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, pp. 264-302. doi:10.1201/b16714-13

Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 114(2): 149-159. doi:10.1007/s11240-013-0311-5

Darko E, Heydarizadeh P, Schoefs B, Sabzalian MR (2014) Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. *Phil Trans R Soc B* 369:1-7. doi:10.1098/rstb.2013.0243

Des Marais DL, Juenger TE (2015) Brachypodium and the Abiotic Environment. In: Vogel JP (ed) *Genetics and genomics of Brachypodium*, Springer, New York, pp. 291-311. doi:10.1007/7397_2015_13

Didi V, Jackson P, Hejatko J (2015) Hormonal regulation of secondary cell wall formation. *J Exp Bot* 66 (16): 5015-5027. doi:10.1093/jxb/erv222

Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 127(4): 1539-1555. doi:10.1104/pp.010196

Dong C, Shao L, Liu G, Wang M, Liu H, Xie B, Li B, Fu Y, Liu H (2015) Photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield of wheat exposed to intermittent light irradiation with millisecond-scale periods. *J Plant Physiol* 184:28-36. doi:10.1016/j.jplph.2015.06.012.

Fang W, Jao RC (2000) A review on artificial lighting of tissue cultures and transplants. In: Kubota C and Chun C (eds.) *Transplant production in the 21st century*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 108-113.

Fras A, Maluszynska J (2004) The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* 121(2):145-154. doi:10.1023/B:GENE.0000040375.18684.82

Fankhauser C, Staiger D (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 216(1): 1-16. doi:10.1007/s00425-002-0831-4

Fry SC (2001) *Plant Cell Wall Biosynthesis*. eLS1: 2-8. doi:10.1038/npg.els.0001683

Guillon F, Bouchet B, Frederic Jamme F, Robert P, Quemener B, Barron C, Larre C, Dumas P, Saulnier L (2010) *Brachypodium distachyon* grain: characterization of endosperm cell walls. *J Exp Bot* 62(3): 1001-1015. doi:10.1093/jxb/erq332

Jeyaseelan M, Rao M (2005) Biochemical studies of embryogenic and non-embryogenic callus of *Cardiospermum halicacabum* L. *Indian J Exp Biol* 43(6): 555-560.

Hasterok R, Betekhtin A, Borowska-Zuchowska N, Braszewska-Zalewska A, Idziak-Helmcke D, Robaszkiewicz E, Wolny E. *Molecular Cytogenetics in the Genus Brachypodium*. In: Vogel JP (ed) *Genetics and Genomics of Brachypodium*, Springer, New York, pp. 39-54. doi:10.1007/7397_2015_1

International Brachypodium Initiative (IBI) (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763-768. doi:10.1038/nature08747

Jeong DH, Schmidt SA, Rymarquis LA, Park S, Ganssmann M, German MA, Green PJ (2013) Parallel analysis of RNA ends enhances global investigation of microRNAs and target RNAs of *Brachypodium distachyon*. *Genome Biol* 14: 1-22. doi:10.1186/gb-2013-14-12-r145.

Joint Genome Institute (2017) Disponível em :<<http://jgi.doe.gov/our-science/science-programs/plant-genomics/brachypodium/>>. Data de acesso: 09 de março de 2017.

Jung ES, Lee S, Lim SH, Ha SH, Liu KH, Lee CH. (2013) Metabolite profiling of the short-term responses of rice leaves (*Oryza sativa* cv. Ilmi) cultivated under different LED lights and its correlations with antioxidant activities. *Plant Sci* 210: 61-69. doi:10.1016/j.plantsci.2013.05.004.

Kellogg EA, Camara PEAS, Rudall PJ, Ladd P, Malcomber ST, Whipple CJ, Doust A N (2013) Early inflorescence development in the grasses (Poaceae). *Front Plant Sci* 4: 1-16. doi:10.3389/fpls.2013.00250

Kellogg EA (2015) Description of the family, vegetative morphology and anatomy. In: Kellogg EA (ed.) *The families and genera of vascular plants: Flowering Plants. Monocots, Poaceae*, Springer, New York, pp. 3-23.

Khan MA, Abbasi BH, Ali H, Ali M, Adil M, Hussain, I (2015) Temporal variations in metabolite profiles at different growth phases during somatic embryogenesis of *Silybum marianum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 120(1): 127-139. doi:10.1007/s11240-014-0587-0

Kuo TC-Y, Chen C-H, Chen S-H, Lu I-H, Chu M-J, Huang L-C, Lin C-Y, Chen C-Y, H-F, Jeng ST, Chen L-FO (2015) The effect of red light and far-red light conditions on secondary metabolism in Agarwood. *BMC Plant Bio* 15: 1-10. doi:10.1186/s12870-015-0537-y

Matos DA, Whitney IP, Harrington MJ, Hazen SP (2013) Cell Walls and the Developmental Anatomy of the *Brachypodium distachyon* Stem Internode. PLoS ONE 8:1-9. doi:10.1371/journal.pone.0080640. eCollection 2013

Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, Ko CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro. Horticonviron Biotechnol 56(1): 105-113. doi:10.1007/s13580-015-0114-1

Manivannan A, Soundararajan P, Park YG, We H, Kim S, Jeong BR (2017) Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of in vitro-grown carnations 'Green Beauty' and 'Purple Beauty'. Horticonviron Biotechnol 58(1): 12-20. doi:10.1007/s13580-017-0051-2

Marriott PE, Sibout R, Lapierre C, Fangel JU, Willats WGT, Hofte H, Gómez LD, McQueen-Mason SJ (2011) Range of cell-wall alterations enhance saccharification in *Brachypodium distachyon* mutants. PNAS 2014 111 (40): 14601-14606. doi:10.1073/pnas.1414020111 Van Acker et al., 2013

Mur LA, Allainguillaume J, Catalán P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel J (2011) Exploiting the *Brachypodium* tool box in cereal and grass research. New Phytol 191(2): 334-347, 2011. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03748.x

Oikawa A, Lund CH, Sakuragi Y, Scheller HV (2013) Golgi-localized enzyme complexes for plant cell wall biosynthesis. Trends Plant Sci 18(1): 49-58. doi:10.1016/j.tplants.2012.07.002

Ouzounis T, Fretté X, Rosenqvist E, Ottosen CO (2014) Spectral effects of supplementary lighting on the secondary metabolites in roses, chrysanthemums, and campanulas. J Plant Physiol 171: 1491-1499. doi:10.1016/j.jplph.2014.06.012

OuYang F, Mao J-F, Wang J, Zhang S, Li Y (2015) Transcriptome analysis reveals that red and blue light regulate growth and phytohormone metabolism in norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. PLoS ONE 10(8): 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0127896

Pacurar DI, Thordal-Christensen H, Nielsen KK, Lenk I (2008) A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. Transgenic Res 17(5): 965-975. doi:10.1007/s11248-007-9159-y

Petrik DL, Cass CL, Padmakshan D, Foster CE, Vogel JP, Karlen SD, Ralph J, Sedbrook JC (2016) BdCESA7, BdCESA8, and BdPMT utility promoter constructs for targeted expression to secondary cell-wall-forming cells of grasses. Front Plant Sci 77: 713-726. doi:10.3389/fpls.2016.00055

Poudel PR, Kataoka I, Mochioka R (2008) Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92: 147-153. doi:10.1007/s11240-007-9317-1

Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* 6(11): 1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613

Rancour DM, Hatfield RD, Marita JM, Rohr NA, Schmitz RJ (2015) Cell wall composition and digestibility alterations in *Brachypodium distachyon* achieved through reduced expression of the UDP-arabinopyranose mutase. *Front Plant Sci* 6: 1-20. doi:10.3389/fpls.2015.00446. eCollection 2015.

Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler, TC, Hazen SP (2013) Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid O-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnol* 13: 1-18. doi:10.1186/1472-6750-13-61

Vogel JP, Garvin DF, Leong OM, Hayden DM (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 84(2): 199-211, 2006.

Vogel J, Hill T (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 27: 471-478. doi:10.1007/s00299-007-0472-y

Vogel JP (2015) The rise of *Brachypodium* as a model system. In: Vogel JP (ed): *Genetics and Genomics of Brachypodium*, New York, pp. 1-7. doi:10.1007/7397_2015_14

Wang XY, Xu XM, Cui J (2015) The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light. *Photosynthetica* 53(2): 213-222. doi:10.1007/s11099-015-0083-8

Wang Y, Bouchabke-Coussa O, Lebris P, Antelme S, Soulhat C, Gineau E, Dalmais M, Bendahmane A, Morin H, Mouille G, Legée F, Cézard L, Lapierre C, Sibout R (2015) LACCASE5 Is Required for Lignification of the *Brachypodium distachyon* Culm. *Plant Physiology* 168(1):192-204. doi:10.1104/pp.114.255489

Wickramasuriya AM, M Dunwell JM (2015) Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis in vitro. *BMC Genomics* 16:2-23. doi:10.1186/s12864-015-1504-6

CAPÍTULO 1

Potencial regenerativo, perfil metabólico e estabilidade genética durante sucessivos subcultivos de calos embriogênicos de *Brachypodium distachyon*

Resumo

Brachypodium distachyon, espécie modelo para gramíneas forrageiras e cereais, tem sido útil nos estudos que buscam melhorias na produção de biomassa e aumento do rendimento para a produção de biocombustíveis. A embriogênese somática (ES) é a via morfogênica que fundamenta a regeneração in vitro da espécie. Todavia, há lacunas para estudos que visem à caracterização do perfil metabólico e da estabilidade genética ao longo de subcultivos sucessivos. Com este objetivo, analisaram-se variáveis fisiológicas e o perfil metabólico de calos embriogênicos (CE) e estruturas embriogênicas (EE) oriundos de sucessivos subcultivos (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 360 dias). Por meio das discriminantes canônicas verificou-se que os CE foram separados em três grupos: 90; 60 e 120 a 240 dias. CE de 60 e 90 dias apresentaram maior potencial regenerativo em meio contendo 2,4-D. CE de 90 dias submetidos a meio de indução de ES contendo 2 mg L⁻¹ de cinetina foram os maiores produtores de EE. Perfis de metabólitos de calos não-embriogênicos (CNE), CE e EE foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) que discriminou dois grupos: o de 30 a 240 dias e o de 360 dias. Dentre os metabólitos que mais contribuíram para a discriminação desses grupos estão o ácido malônico, triptofano, asparagina e eritrose. A análise de PCA de EE também separou as diferentes idades em grupos, sendo o grupo que abrangeu 60 e 90 dias o mais indicado para o subcultivo de *B. distachyon*, devido aos seus altos níveis de vários metabólitos. Os metabólitos-chave para distinguir entre os grupos de EE foram o galactinol, o oxaloacetato, o triptofano e a valina. Além disso, metabólitos secundários como o ácido cafeoilquínico, o ácido cinâmico e o ácido ferúlico foram importantes na fase de CE. Os ácidos ferúlico, cinâmico e fenilacético marcaram as quedas da capacidade regenerativa. O baixo acúmulo dos aminoácidos ácido aspártico, asparagina, triptofano e glicina caracterizam CNE, sugerindo serem indispensáveis para a competência embriogênica em *B. distachyon*. A estabilidade genética das plantas regeneradas foi avaliada por citometria de fluxo, mostrando que a instabilidade da ploidia em plantas regeneradas de calos de *B. distachyon* não está

relacionada com a idade dos calos. Conclui-se que a perda da capacidade regenerativa de CE em *B. distachyon* ocorre somente a partir de 120 dias, mostrando que o uso de CE pode ser estendido para 90 dias de cultivo.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, embriogênese somática, metabolômica, ploidia.

Abstract

Brachypodium distachyon, a model species for forage grasses and cereal crops, has been useful in studies that seek improvements for biomass production and increasing crop yield for the production of biofuels. Somatic embryogenesis (SE) is the morphogenic pathway that supports in vitro regeneration of the species. However, there are gaps for studies aiming to characterize the metabolic profile and genetic stability along successive subcultures. The physiological variables and the metabolic profile of embryogenic callus (EC) and embryogenic structures (ES) from successive subcultures (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 and 360 days long) were analyzed. Canonical discriminant analysis separated EC into three groups: 90; 60 and 120 to 240 days. EC with 60 and 90 days showed higher regenerative potential. EC of 90 days submitted to SE induction in 2 mg L^{-1} of kinetin-supplemented medium was the greater ES producer. The metabolite profiles of non-embryogenic callus (NEC), EC and ES submitted to principal component analysis (PCA) separated into two groups: 30 to 240-day and 360-day. The most important metabolites for these groups were malonic acid, tryptophan, asparagine and erythrose. PCA of ES also separated ages into groups and ranked 60 and 90 days as the best for use due to their high levels of various metabolites. The key metabolites that distinguished the ES groups were galactinol, oxaloacetate, tryptophan, and valine. In addition, significant secondary metabolites such as caffeoylquinic acid, cinnamic acid and ferulic acid were important in the EC phase. Ferulic acid, cinnamic acid and phenylacetic acid marked the decreases in the regenerative capacity of ES in *B. distachyon*. Decreased accumulations of the amino acids aspartic acid, asparagine, tryptophan and glycine characterize NEC, suggesting that they are indispensable for the embryogenic competence in *B. distachyon*. Genetic stability of the regenerated plants was evaluated by flow cytometry, showing that the ploidy instability in regenerated plants from *B. distachyon* callus is not related to age. It is concluded that the loss of regenerative capacity in EC in *B. distachyon* occur from 120 days, which demonstrate that the use of EC can be extended to 90 days.

Keywords: Flow cytometry, metabolomics, ploidy, somatic embryogenesis.

Introdução

Brachypodium distachyon tem sido usada com êxito como modelo para estudos de parede celular, arquitetura da planta, propriedades dos grãos e meristemas e controle da floração, com o objetivo de garantir avanços nos estudos para utilização de gramíneas para o fornecimento de alimentos, rações e combustíveis (Draper et al., 2001; Hirano et al., 2013; Rancour et al., 2015; Trafford et al., 2013; Kellogg, 2015; Vogel, 2015). A espécie tem sido estudada por meio da genômica funcional e estrutural (Mur et al., 2011), coleções de marcadores de sequência genética (EST), estudos de função de genes, sejam através da genética direta (forward genetics) e reversa (reverse genetics), sondas citogenéticas e bancos de germoplasma (IBI, 2010; Mur et al., 2011) e mediante a transformação de plantas (Vogel e Hill, 2008; Alves et al., 2009; Vogel, 2015).

O protocolo de transformação de *B. distachyon* já foi estabelecido e alicerçado em eficiente sistema de embriogênese somática (ES). A ES é uma via morfogênica valiosa para o melhoramento genético de plantas quando associada à possibilidade de produção massiva de plantas *in vitro* e à reprodução de plantas transgênicas, sendo um sistema importante para estudar e compreender os diferentes processos que ocorrem durante o desenvolvimento vegetal (Zimmermann, 1993; De-la-Peña et al., 2015).

Devido a suas características de totipotencialidade celular, algumas células somáticas podem diferenciar, tornar-se embriões e desenvolver a ponto de gerar plantas inteiras (Zimmermann, 1993; Verdeil et al., 2001, 2007). Durante a ES, os reguladores de crescimento controlam a expressão espacial e temporal de múltiplos genes, a fim de iniciar a mudança no programa genético das células somáticas, bem como a transição entre as fases de desenvolvimento do embrião (Rocha e Dornelas, 2013; Fehér, 2015). Nesse contexto o estudo detalhado das possíveis alterações metabólicas ocorridas durante o cultivo de calos embriogênicos (CE) ao longo do tempo também é necessário, uma vez que o mecanismo de ação da maioria dos elementos biológicos importantes para a regulação da ES e o desenvolvimento de um embrião é pouco conhecido.

Em *B. distachyon* a obtenção de CE é de fundamental importância para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Bablak et al. (1995) foram os primeiros a propor um protocolo de indução de CE a partir de sementes com embriões maduros de *B. distachyon*. A capacidade de regeneração de embriões maduros é limitada na maioria das espécies de Poaceae, tais como trigo, milho, sorgo e cevada (Ye e Tao, 2008), sendo o sucesso das técnicas de transformação e regeneração baseado

na cultura de calo altamente embriogênico (Hansen e Wright, 1999). Isto tem sido alcançado em *B. distachyon* usando-se embriões zigóticos imaturos, que mostram elevada capacidade regenerativa in vitro com adição de 2,4-D no meio (Draper et al., 2001; Vogel et al., 2006; Pacurar et al., 2008; Vogel e Hill 2008; Alves et al., 2009; Zombori et al., 2011; Lee et al., 2011).

Contudo, enfrentam-se dificuldades durante o processo de aquisição de CE, tais como a necessidade de grande número de sementes para extração de embriões e o isolamento de embriões imaturos que consomem tempo e trabalho. Além disso, com o tempo as culturas de CE perdem sua estabilidade genética e potencialidade, o que leva à redução da capacidade de regeneração das plantas e obtenção de plantas inférteis. Alves et al. (2009) comentaram que extensos períodos de cultivo e subcultivo de CE causam variações genéticas, levando até ao aumento de regeneração de plantas albinas. Os autores utilizaram CE, com no máximo 45 dias de cultivo para o protocolo de transformação de plantas. Vogel e Hill (2008), Bragg et al. (2015) indicam 50 dias e Lee et al. (2011) 65 dias. Porém, não há informações na literatura, alicerçadas em estudos sistematizados que enfatizem a idade limite de utilização de CE oriundos de sucessivos subcultivos e sua capacidade de regenerar plantas normais, incluindo informações acerca da estabilidade genética do material em cultivo, característica fundamental para o sucesso na obtenção de plantas via ES (Pinto et al., 2010; Lema-Rumińska e Śliwińska, 2015; San José et al., 2015).

Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito de sucessivos subcultivos no potencial de regeneração e seus efeitos na estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de embriões imaturos, bem como caracterizar o perfil de metabólitos associado à manutenção ou perda das respostas regenerativas das culturas. Conclui-se que a regeneração de plantas em *B. distachyon* é afetada pela idade dos CE e sua capacidade de gerar EE, bem como que há metabólitos-chave na manutenção do potencial embriogênico das culturas ao longo de sucessivos subcultivos.

Material e métodos

Material vegetal

Sementes de *B. distachyon* (L.) P. Beauv. ($2n = 10$), da linhagem Bd-21 foram cedidas pelo Dr. John Vogel (USDA-ARS Western Regional Research Center, Albany, EUA.). A semeadura foi feita em vasos plásticos com capacidade de 350 mL (EME-A-EME Ind. Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil) contendo a mistura (2:1) de substrato orgânico Tropstrato[®] (Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda, Mogi Mirim, SP, Brasil) e vermiculita de granulometria média, sendo submetidas à vernalização (4 °C por 7 dias), para sincronizar a germinação. Logo após as plântulas foram levadas para câmaras de crescimento (Thermo Scientific Precision, modelo 818), no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil, e fertilizadas semanalmente com solução de Hoagland modificada (Yordem et al., 2011). As plantas foram mantidas a 22 °C, sob irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16:8 h (luz: escuro), providos por iluminação fluorescente branca. Após cinco semanas o fotoperíodo foi alterado para 20:4 h (luz: escuro), visando a indução do florescimento.

Produção de calos embriogênicos (CE)

Sementes imaturas (coletadas após 8-12 semanas) foram dispostas em placa de Petri e esterilizadas superficialmente em câmara de fluxo laminar, utilizando-se etanol 70% durante 30 segundos e enxágue com água destilada estéril, seguida de hipoclorito de sódio com 1,3% de cloro ativo durante 4 minutos e triplo enxágue com água destilada e estéril. Em câmara de fluxo laminar, sob estereomicroscópio e com auxílio de uma pinça fina foi removida a casca (pálea e lema) das sementes imaturas, coletando-se os embriões imaturos com endosperma leitoso. Os eixos embrionários foram cultivados em placas de Petri em meio MSB3 (Alves et al., 2009), contendo sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), 4 g L⁻¹ de EDTA-Fe, 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,6 mg L⁻¹ de CuSO₄ e 2 g L⁻¹ de Phytigel[®] (SigmaChem. Co, St. Louis, MO, USA). O pH do meio foi ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas a 25 °C, no escuro e após três semanas, CE com cor creme foram fragmentados e cultivados por mais 2 semanas em meio MSB3 recém-preparado.

Avaliação da idade dos calos embriogênicos (CE) e regeneração de plantas

Calos com idades de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 360 dias foram cultivados em meio de regeneração contendo sais de MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma), 2 mg L⁻¹ de cinetina e pH 5,8 para a indução de plântulas durante 30 dias. Calos com diferentes idades foram avaliados quanto à área de proliferação (mensurando a área inicial e final de crescimento dos calos), índice de regeneração (número de plântulas), formação de estruturas embriogênicas (EE) (mistura da transição de CE a embriões somáticos, incluindo células proembriogênicas, embrião globular a cordiforme) e número de plantas albinas.

Análises de metabólitos

Calos não-embriogênicos (CNE) de 30 dias e CE de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 360 dias e EE oriundos das idades 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias foram submetidos à análises de metabólitos. A extração de metabólitos primários, derivatização, adição de padrão e de injeção de amostra para cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) foram realizadas de acordo com Lisec et al. (2006), com modificações. A extração de metabólitos de CE e EE foram realizadas com 10 mg de tecido liofilizado e pulverizado com nitrogênio líquido com a adição da solução extratora contendo metanol:clorofórmio:água nas proporções 2,5:1:1 (v/v/v) e 60 µL por amostra do padrão interno ribitol (0,2 mg mL⁻¹ em H₂O). As amostras foram derivatizadas adicionando metoxiaminohidroclorido (20 mg mL⁻¹ em piridina). Foi adicionado o silanizante N-metil-N-trimetil-sililtrifluoracetamida (MSTFA) e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). O volume de 100 µL foi transferido para os vials para serem aplicados no GC-MS.

O sistema de GC-MS TruTOF é composto por amostrador automático Split/Splitless, cromatógrafo a gás Agilent e espectrômetro TruTOF[®] HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar com 30 m (DB-35 MS, Agilent Technologies) (Lisec et al., 2006). Os cromatogramas e os espectros de massa foram avaliados usando o software Tag Search (Cuadros-Inostroza et al., 2009) e bibliotecas de massa espectrais de compostos derivados de trimetilsilício (TMS) obtido pelo Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de / csbdb>). Depois de

identificados, os valores relativos dos metabólitos foram normalizados pelo peso da amostra e pela mediana do valor relativo.

Citometria de fluxo

Para análise do nível de ploidia de DNA das plantas de *B. distachyon*, foi realizado o censo de plantas regeneradas via embriogênese somática. Fragmentos de folhas jovens foram seccionados em uma placa de Petri (60 x 15 mm com) 500 µL de tampão de extração OTTO-I (Otto, 1990), suplementados com 2 mM de 2-4-ditiotreitol (Sigma[®]), pH 2,3. Subsequentemente, 500 µL do mesmo tampão foram adicionados e a solução foi filtrada em um filtro de náilon de 30 µm (Partec[®]). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido e incubado por 10 minutos em 100 µL tampão de extração OTTO-I (Abreu et al., 2008). A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução OTTO-II (Otto, 1990) suplementada com 75 µM de iodeto de propídeo (IP, Sigma[®]) e 2,0 mM de 2-4-ditiotreitol (pH 7,5) no escuro. Após corar, a suspensão foi filtrada em malha de náilon de 30 µm de mesh. As suspensões foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BDBiosciences). Histogramas com coeficientes de variação (CV) acima de 5% foram descartados. O padrão interno utilizado foi *Zea mays* 'CE-7777' germinado a partir de sementes (Lysák e Doležel, 1998).

Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, considerando-se calos com dez idades diferentes e cinco repetições contendo oito explantes cada para obtenção da média. Somente calos com 60 a 240 dias utilizados devido à sua capacidade regenerativa. As variáveis fisiológicas e de desenvolvimento foram submetidas à MANOVA e à análise discriminante canônica, com o objetivo de identificar a distância entre CE de diferentes idades de *B. distachyon* em gráfico de dispersão bidimensional. Para identificar grupos de tratamentos (idades), foi aplicado o método de agrupamento de otimização de Tocher, utilizando a distância quadrada generalizada de Mahalanobis (D^2). A qualidade do agrupamento foi avaliada por meio do coeficiente de correlação cofenética (r). Utilizou-se, também, o critério de Singh (1981) para quantificar a contribuição relativa das variáveis utilizadas para discriminar

os tratamentos. As análises foram realizadas utilizando o programa computacional Genes (Cruz, 2013).

Para o perfil metabólico foram realizados MANOVA, análise de Componentes Principais (PCA) e mapa de calor dos metabólitos identificados, criados no Multiexperiment Viewer Versão 4.9 (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, EUA, disponível gratuitamente no site <http://www.tm4.org/mev.html>). As análises de Componentes Principais (PCA) foram realizadas no software Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) (Xia et al., 2009, 2012, 2015). Realizou-se o teste t de Student para examinar diferenças nos níveis de metabólitos, usando a idade de 30 dias como controle de CE e 60 dias para controle de EE.

Resultados

A regeneração de plantas em *Brachypodium distachyon* é afetada pela idade dos calos embriogênicos (CE) e por sua capacidade de gerar estruturas embriogênicas (EE)

As medidas de divergência entre os tratamentos, estimadas a partir da distância de Mahalanobis (D^2), apresentaram magnitude de 1,277 a 60,077, indicando ampla variabilidade entre as idades dos CE de *B. distachyon* estudados. O coeficiente de correlação cofenética (ccc) foi de 0,79, indicando adequação do método de agrupamento (Rohlf, 1970).

Com base na contribuição relativa das variáveis analisadas para CE, verificou-se que as variáveis que mais contribuíram para caracterização das idades de CE foram a formação de EE e o índice de regeneração. A formação de EE contribuiu com 43,03% para divergência total, enquanto a índice de regeneração contribuiu com 26,84%. A área de crescimento e número de plantas albinas apresentaram contribuições menores (Tabela 1).

Tabela 1 - Cargas nas duas principais variáveis canônicas e contribuição relativa das variáveis originais, pelo método proposto por Singh (1981), de sete idades de calos embriogênicos de *Brachypodium distachyon*

Variável original	Cargas		Contribuição relativa (%)
	Can 1	Can 2	
Estruturas embriogênicas	0,48	-0,11	43,03
Índice de regeneração	0,67	0,73	26,84
Área de crescimento	0,30	0,67	18,73
Plantas albinas	0,63	-0,39	11,40

As duas primeiras variáveis canônicas explicaram cerca de 94,50% da variabilidade entre as idades de subcultivos de CE de *B. distachyon* (66,2 % e 28,3%, respectivamente) (Tabela 2), explicando quase toda a variância encontrada entre as idades de CE de *B. distachyon* e permitindo representá-la em um gráfico de dispersão bidimensional (Figura 1).

Tabela 2 - Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas a partir das variáveis originais, em sete idades de calos embriogênicos (CE) de *Brachypodium distachyon*

Variáveis canônicas	Autovalores	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	8,45	66,17	66,17
2	3,62	28,34	94,51
3	0,47	3,66	98,16
4	0,23	1,84	100,0

A análise de agrupamento pelo método de Tocher, baseada na matriz de Mahalanobis, separou as idades de CE em três grupos distintos. O grupo 1 abrangeu 120, 150, 180, 210 e 240 dias, os quais apresentaram a menor distância na matriz de Mahalanobis (Figura 1). CE com 60 dias formaram o segundo grupo e apresentaram altos índices de formação de EE e capacidade regenerativa. O grupo três comportou apenas CE com 90 dias, os quais apresentaram as melhores respostas regenerativas, com maiores rendimentos de EE, indicando ser a melhor idade para produção de plantas.

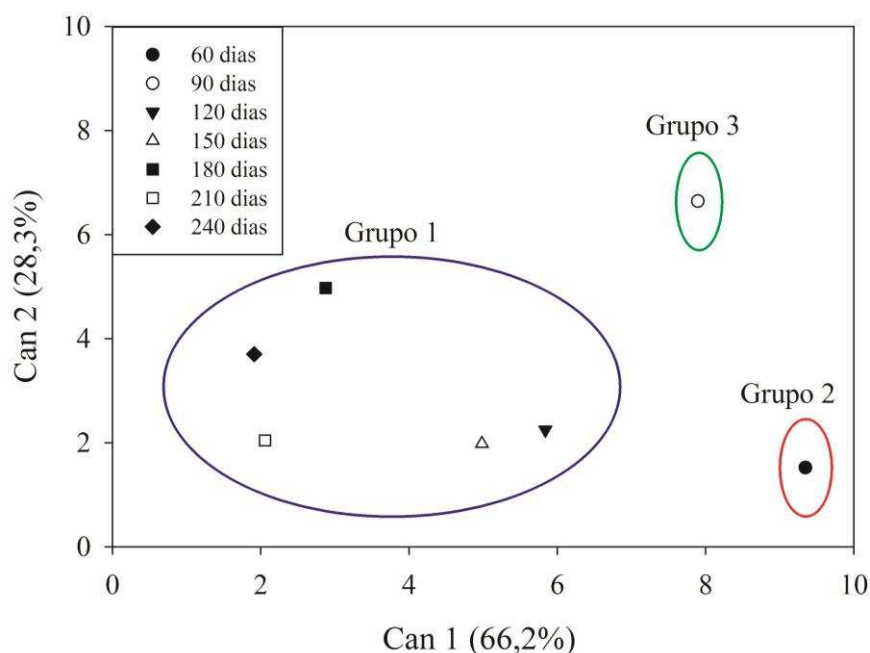


Figura 1 - Dispersão gráfica bidimensional de sete idades de calos embriogênicos (CE) avaliadas em *Brachypodium distachyon* nas duas primeiras variáveis canônicas.

Perfil metabólico de calos embriogênicos (CE) e estruturas embriogênicos (EE) em *Brachypodium distachyon*

Utilizou-se de perfil metabólico baseado em GC-MS para fornecer informações sobre a fisiologia de *B. distachyon* durante os sucessivos cultivos de CE e EE. As análises de componentes principais mostram que PC1 (48%) e PC2 (21,4%) separaram os calos em dois grupos distintos: CNE e CE com idade de 30 a 240 dias e com 360 dias (Figura 2A). Um gráfico de carga mostra os metabólitos que mais contribuíram para separação dos grupos, entre eles o ácido malônico, o triptofano, a asparagina e a eritrose, com o aumento de 13 vezes aos 360 dias (Figura 2B). O mapa de cor com 38 metabólitos mostra a separação dos grupos de 30 a 240 dias e 360 dias (Figura 2C).

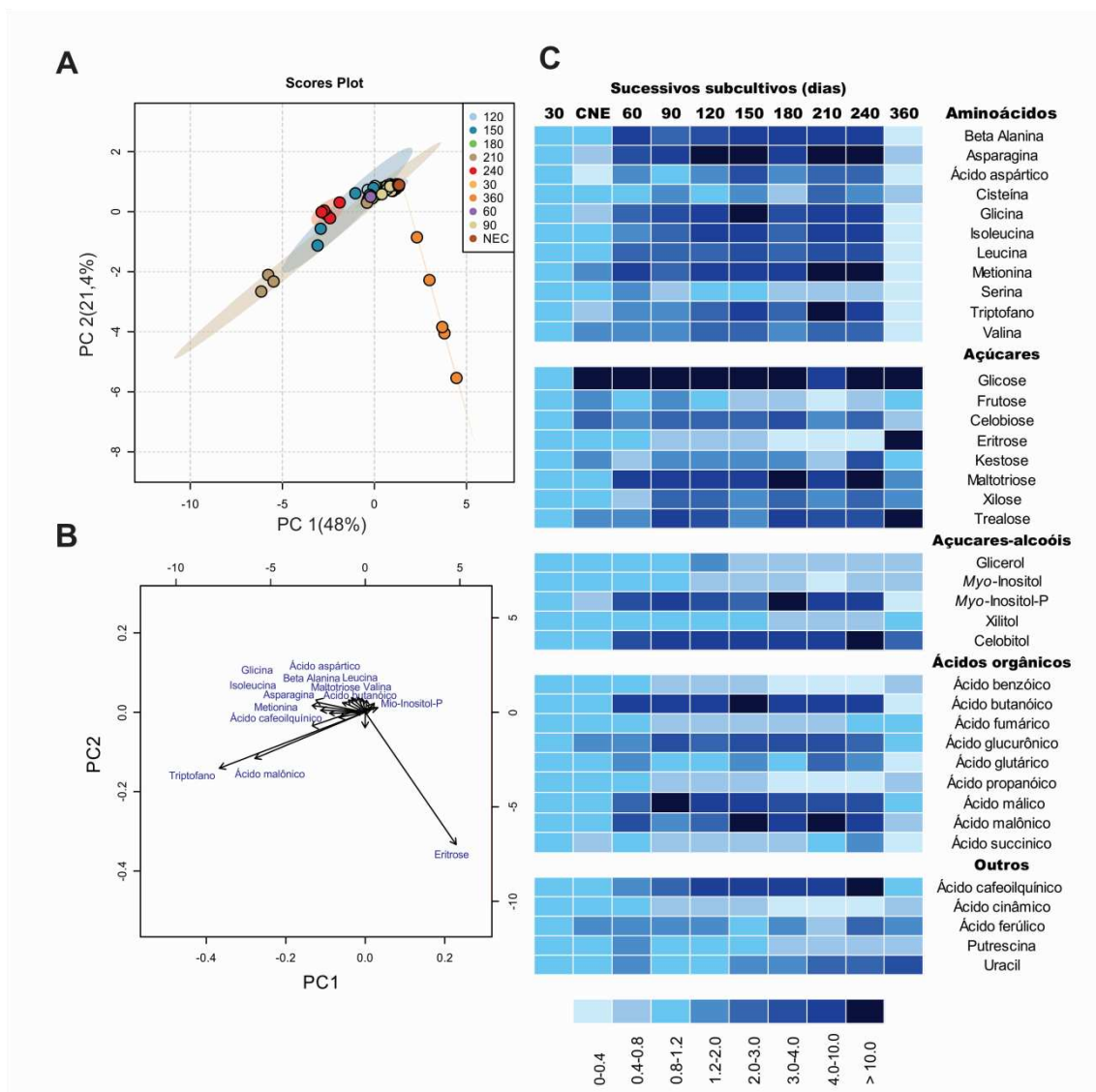


Figura 2 – Calos embriogênicos (CE) e calos não-embriogênicos (CNE) avaliados em *Brachypodium distachyon* in vitro. **A** - Diagrama nos dois primeiros componentes principais. **B** - Cargas das variáveis originais nos dois primeiros componentes principais. **C** - Abundância relativa de 38 metabólitos oriundos de calos embriogênicos de 30 a 360 dias analisados pelo teste t de Student (n = 5). Os valores relativos encontram-se nos Dados Suplementares.

Interessantemente, CNE demonstraram teores significativamente reduzidos dos aminoácidos asparagina, glicina, ácido aspártico e triptofano, além da queda nos teores de mio-inositol-P e ácido succínico, se comparado a 30 dias.

Calos de 60 a 240 dias demonstraram aumento de todos os aminoácidos, à exceção da serina. Os açúcares maltotriose, xilose, trealose e dos açúcares álcool mio-inositol-P e celobitol apresentaram acúmulo no decorrer das idades. Os níveis dos

monossacarídeos frutose e glicose apresentaram comportamento aleatório em função das idades estudadas. Por se tratar de calos e EE desenvolvidas em meio de cultivo com alto teor de sacarose, este metabólito foi desconsiderado das análises.

Entre os ácidos orgânicos, houve pronunciado aumento do ácido butanóico, ácido málico, ácido malônico e ácido glutárico. O ácido cafeiolquínico, como representante dos metabólitos secundários, decresceu no decorrer da idade dos calos. Aos 360 dias, 22 metabólitos entre eles aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, e metabólitos secundários, foram significativamente inferiores ao tratamento controle (30 dias).

Análises de PCA e variância identificaram diferenças chave entre as idades de EE de *B. distachyon*. Os dois primeiros componentes principais com PC1(42,2%) e PC2(23,5%) revelaram três grupos, sendo o primeiro grupo formado por EE com 60 dias, o segundo formado por EE de 90 dias e o terceiro grupo representando 120 a 240 dias. Entretanto, houve sobreposição entre os grupos de EE de 60 e 90 dias (Figura 3A). Destaque-se que alguns metabólitos foram importantes para discriminação dos grupos como o galactinol, o oxaloacetato, o triptofano e a valina (Figura 3B).

Observou-se maior abundância da maioria dos metabólitos em EE de 60 e 90 dias, tendo a maioria dos metabólitos apresentado níveis mais baixos a partir dos 120 dias (Figura 3C). Dos 41 metabólitos, 32 apresentaram quedas significativas em relação ao controle, com exceção para asparagina, histidina e galactose. Os açúcares galactose e melibiose aumentaram, enquanto eritrose, trealose e tagatose tiveram tendência de queda. Os açúcares álcool mio-inositol-P, galactinol e gliceraldeído demonstraram quedas significativas após 90 dias. Ácidos orgânicos como ácido acético, fumárico, glucurônico, oxaloacetato apresentaram redução significativa no conteúdo. Os ácidos cinâmico e ferúlico reduziram após 180 dias. Calos de 360 dias não apresentaram habilidade regenerativa para gerar EE e por isso não foram considerados para a presente análise.

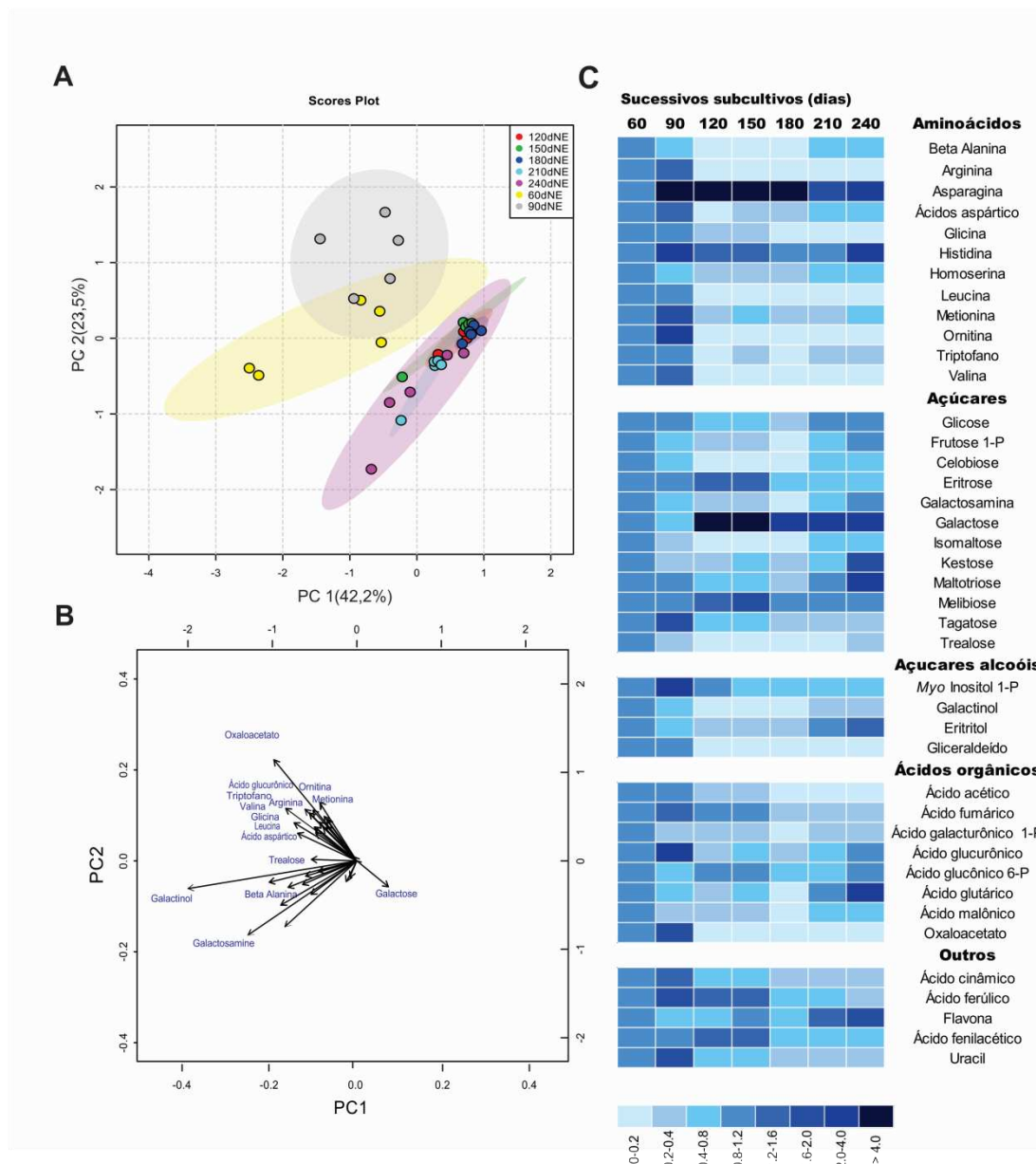


Figura 3 – Estruturas embriogênicas (EE) avaliadas em *Brachypodium distachyon* in vitro. **A** - Diagrama nos dois primeiros componentes principais. **B** - Carga das variáveis originais nos dois primeiros componentes principais. **C** - Abundância relativa de 41 metabólitos oriundos de estruturas embriogênicas de 60 a 240 dias analisados pelo teste t de Student (n = 5). Os valores relativos encontram-se nos Dados Suplementares.

A idade dos calos não alterou o nível de ploidia das plantas regeneradas

Para avaliar o efeito da regeneração via embriogênese somática de *B. distachyon* na estabilidade do nível de ploidia, utilizou-se a citometria de fluxo. O conteúdo de DNA dos núcleos de folhas regeneradas foi analisado. O conteúdo de DNA 2C das

plantas diploides de *B. distachyon* ($2n = 10$) foi estimado em 0,72 pg (Figura 4A), enquanto o conteúdo de DNA 2C das plantas tetraploides de *B. distachyon* foi estimado em 1,43 pg (Figura 4B). Usou-se o padrão interno de referência *Zea mays* ‘CE-777’ ($2C=5,43$ pg DNA). As estimativas foram acompanhadas de coeficientes de variação abaixo de 5% (2,61% e 4,30%), conforme recomendado. Por meio de censo populacional não se observou relação entre a idade dos CE e a instabilidade dos regenerantes, no que diz respeito ao nível de ploidia (Tabela 3).

Tabela 3 - Nível de ploidia de *Brachypodium distachyon* oriundas de calos embriogênicos (CE) de 60 a 240 dias

Idades dos calos	Plantas regeneradas	Plantas diploides (%)	Plantas poliploides (%)
60	28	100	0
90	38	94,74	5,26
120	19	94,74	5,26
150	35	100	0
180	17	94,12	5,88
210	6	83,33	16,67
240	9	100	0

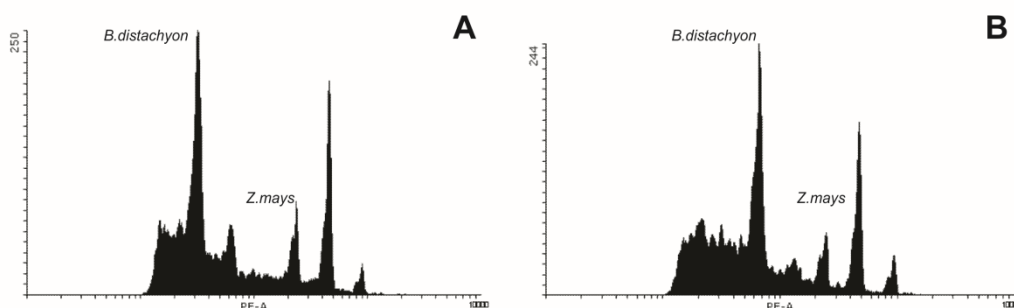


Figura 4 - Estimativas do conteúdo de DNA nuclear de plantas obtidas por embriogênese somática de *Brachypodium distachyon* por citometria de fluxo. O primeiro e o terceiro pico em cada histograma correspondem, respectivamente, a *B. distachyon* e ao padrão interno de referência *Zea mays* ‘CE-777’ ($2C=5,43$ pg/DNA). **A** - Planta diploide obtida de calos embriogênicos (CE) com 120 dias de idade ($2C=0,72$ pg/DNA); **B** - Planta tetraploide obtida de calos embriogênicos (CE) de 210 dias de idade ($2C=1,43$ pg/DNA).

Discussão

Processos bioquímicos, fisiológicos e genéticos associados à embriogênese somática (ES), foram caracterizados em calos embriogênicos (CE) e estruturas embriogênicas (EE) de *B. distachyon*. As variáveis de crescimento do calo, índice de regeneração, estabilidade das plantas geradas e perfil metabólico de CE em meio de indução foram comparados em CE submetidos ao meio indutor e de regeneração de plantas durante um ano. As variáveis fisiológicas selecionadas (Tabela 1) foram eficientes na caracterização da qualidade de CE de *B. distachyon* por possuírem contribuições importantes na discriminação entre as idades dos calos (Figura 1).

Verificou-se que a capacidade de gerar plantas dos CE de *B. distachyon* tem seu ápice aos 90 dias, seguida por queda gradativa à medida que o número de dias avançam. Esses resultados diferem dos reportados por Vogel e Hill (2008), Alves et al. (2009) e Lee et al. (2011), uma vez que estendem a possibilidade do uso do calo para mais de 60 dias. Lee et al. (2011) destacaram que a idade dos calos e a escolha do sistema de vetor incluindo marcadores de seleção devem ser considerados, pois influenciam na transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*. A formação dos grupos de idades de calos representa uma valiosa informação na escolha de uso dos CE para ES e regeneração de plantas, sem perder a qualidade das plantas regeneradas.

O perfil metabólico revelou o envolvimento de metabólitos-chave associados ao potencial regenerativo. Calos de 60 a 240 dias apresentaram maiores acúmulos de ácidos orgânicos (ácidos málico e malônico) em relação aos calos não-embriogênicos e os de 360 dias. Os ácidos málico e malônico caracterizaram as quedas de crescimento e capacidade regenerativa das culturas em diferentes idades de calos de *B. distachyon* e o fim da atividade metabólica em calos de 360 dias. O ácido dicarboxílico malônico é produto do malato-oxaloacetato. Esse acúmulo dos ácidos málico e malônico pode ser resultante da reação de descarboxilação do oxaloacetato. O malato tem papel fundamental no equilíbrio redox da célula vegetal, através de sua realocação entre diferentes compartimentos celulares. Além de inibidor da respiração celular, por inibir a succinato desidrogenase, é precursor da biossíntese de lipídeos neutros através da síntese de acetato via Acetil-CoA carboxilase (Igamberdiev e Eprintsev, 2016). Há relatos de sua relação com respostas a estresses abióticos (Kim, 2002; Igamberdiev e Eprintsev, 2016). Os ácidos orgânicos são sintetizados em plantas como resultado da oxidação incompleta de produtos fotossintéticos e atuam como reservatórios de carbono

que podem ser convertidos em carboidratos ou sofrer oxidação terminal, resultando em CO₂ e H₂O (Igamberdiev e Eprintsev, 2016).

A natureza intermediária dos ácidos orgânicos determina a flexibilidade de seu uso no metabolismo vegetal. O esqueleto de carbono dos ácidos orgânicos também pode ser usado para a biossíntese de aminoácidos. O acúmulo dos ácidos orgânicos permitiu a manutenção dos aminoácidos endógenos beta alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, isoleucina, metionina, triptofano e valina, que demonstraram estar envolvidos na diferenciação e na morfogênese de *B. distachyon* de 60 a 240 dias. Recentemente, asparagina, triptofano e glicina foram relatados por promoverem o desenvolvimento de embriões somáticos (Khan et al., 2015; Heringer et al., 2015, Ng et al., 2016). Dessa forma, os baixos teores dos aminoácidos ácido aspártico, asparagina, triptofano e glicina caracterizam CNE. O ácido aspártico é precursor da asparagina, composto chave no transporte e armazenamento de nitrogênio plantas. Também é precursor comum dos aminoácidos essenciais lisina, treonina, metionina e isoleucina (Azevedo et al., 2006). Sugere-se que esses metabólitos, encontrados em baixas concentrações em CNE, possam ser utilizados como marcadores indicativos da embriogênese e, portanto, indispensáveis para a aquisição da competência embriogênica em *B. distachyon*.

O triptofano parece ter papel importante durante a ES. A principal via de biossíntese de auxina é um processo de duas etapas, em que há conversão do triptofano em ácido indolil-3-acético (AIA), processo vital e altamente conservado em todo o reino vegetal (Capron et al., 2009; Zhao, 2012; Gao e Zhao, 2014). O acúmulo de triptofano pode ter correlação com a queda dos níveis endógenos ativos de auxina nos CE de *B. distachyon*, de acordo com o aumento da idade das culturas de calos. Gao e Zhao (2014) relatam que a degradação da auxina desempenha papel essencial na manutenção da homeostase na regulação do desenvolvimento das plantas. O controle de auxina é rigoroso e quando ocorre a desativação de AIA, as moléculas componentes são convertidas rapidamente em aminoácidos, açúcares e outras moléculas pequenas (Gao e Zhao, 2014).

A pentose fosfatada eritrose apresentou queda no decorrer das idades dos calos. A eritrose, juntamente com o triptofano, medeiam a transição dos carbonos do metabolismo primário para o secundário através da via do ácido chiquímico, responsável pela síntese de uma gama de metabólitos secundários (Heringer et al., 2015) representados em CE de *B. distachyon* pelo ácido cafeoilquínico. Heringer et al. (2015)

verificaram, em cana-de-açúcar, que os metabólitos secundários foram importantes para a aquisição de competência celular durante o desenvolvimento de embriões somáticos.

O acúmulo de açúcares como trealose, pode atuar como indutor de defesas em situação de estresse abiótico (Tayeh et al., 2015). Adicionalmente, os açúcares álcool agem como antioxidantes que neutralizam espécies reativas de oxigênio (Nishizawa et al., 2008). O mio-inositol-P pode estar envolvido na capacidade regenerativa de *B. distachyon*, pois atua na sinalização celular, uma vez que se liga a outras moléculas para formar mensageiros (Luo et al., 2011). É essencial para manter a estrutura e o tráfego nas endomembranas, o que é crítico para o correto transporte de auxina e a correta localização de auxina durante a formação do padrão embrionário (Abid et al., 2009; Luo et al., 2011).

Os perfis de metabólitos são altamente dinâmicos, mas refletem a situação fisiológica para um determinado ponto no tempo (Winkelmann et al., 2015). As mudanças metabólicas que ocorrem no calo durante a embriogênese somática em *B. distachyon* (passagem de meio indutor para meio de regeneração) podem ser observadas no decréscimo do teor da maioria dos metabólitos endógenos ao longo do tempo. O oxaloacetato se destacou pelos altos níveis em EE de 60 e 90 dias seguido por queda, ajudando a descrever as alterações metabólicas pelas quais os CE passaram no decorrer dos subcultivos. Além de atuar no equilíbrio redox das células, participa da produção e consumo de ATP, suporte de gradientes protônico e iônico em membranas e acidificação de espaços extracelulares (Igamberdiev e Eprintsev, 2016). A redução dos níveis de ácido glucurônico colaborou para diferir entre as idades dos EE. O ácido glucurônico é necessário para biossíntese de pectinas e compostos não celulósicos. As pectinas são os componentes da matriz extracelular em culturas embriogênicas de *B. distachyon* e as diferenças espaciais são correlacionadas com a natureza embriogênica das células, sendo utilizadas com marcador molecular de células embriogênicas (Betekhtin et al., 2016).

Os níveis mais elevados de aminoácidos em EE de *B. distachyon* aos 60 e 90 dias pode ser devido à exigência de aminoácidos para a diferenciação e divisão celular que levam à regeneração da planta. A valina e a leucina são exemplos de aminoácidos já mencionados na literatura como marcadores do início da embriogênese somática em coqueiro (*Cocos nucifera*) (Magnaval et al., 1995) em que ocorre aumento dos seus teores. A quantidade de triptofano para CE aumentou no decorrer da idade dos calos e em EE e apresentou altos níveis aos 60 e 90 dias, seguidos por queda progressiva nas

demais idades. Tal tendência pode ser devido ao estabelecimento do gradiente de auxina, um marcador do potencial embriogênico, diferenciação e padrão apical-basal no embrião (Wang et al., 2015; Nascimento-Gavioli et al., 2017). O triptofano atua como precursor bioquímico chave para o AIA, essencial durante o desenvolvimento embrionário zigótico (Zhao, 2012; Wang et al., 2015) e somático (Siriwardana e Nabors, 1983; Khan et al., 2015; Heringer et al., 2015).

A manutenção dos teores de melibiose em relação aos açúcares que sofreram queda sugere que possui um papel sinalizador, acumulando-se durante eventos de estresses (Jespersen e Huang, 2015). O aumento de galactose EE em pode indicar sua importância durante a ES. A galactose aumentou cinco vezes mais em embriões somáticos que em embriões zigóticos de *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2015).

Galactinol e mio-inositol-P foram os açúcares álcool que se destacaram em EE de *B. distachyon*. Juntamente com o galactinol, o mio-inositol transporta galactose ativada para produzir rafinose e seus derivados (Nadwodnik e Lohaus, 2008). O galactinol é um oligossacarídeo da família rafinose que funciona como osmoprotetor em células vegetais, reduzindo os riscos de danos oxidativos causados por estresses abióticos. Em *Arabidopsis thaliana* o aumento de galactinol causou maior tolerância das células vegetais contra danos oxidativos causados por salinidade e baixa temperatura (Nishizawa et al., 2008; Sengupta et al., 2015).

Metabólitos secundários importantes foram detectados nas amostras. Ácidos fenólicos, em sua maioria regulados pela fenilalanina amônia liase (PAL), sofreram alterações em sua concentração com o avançar das idades dos calos. Assim, os ácidos benzóico e cinâmico apresentaram redução em CE, enquanto que a concentração de ácido ferúlico se manteve. Para EE, os ácidos ferúlico, cinâmico e fenilacético marcaram as quedas da capacidade regenerativa de *B. distachyon*. Estes produtos do metabolismo dos fenilpropanoídes estimulam a diferenciação adequada para embriogênese, atuando como componentes antioxidantes não-enzimáticos. Para *Silybum marianum*, uma espécie medicinal, a PAL desencadeou o crescimento de embriões somáticos normais, contornando o estresse oxidativo mediante a sinalização da rota dos fenilpropanoídes (Abbasi et al., 2016).

Os ácidos hidroxicinâmicos, encontrados em diferentes fases dos CE de *B. distachyon*, compõem um grupo de fenólicos abundante em cereais, e conhecidos por fortes propriedades antioxidantes. O ácido ferúlico e seus produtos oxidativos são os ácidos hidroxicinâmicos mais abundantes nos cereais e, em menores quantidades

ocorrem o ácido sinápico, ácido p-cumárico e derivados do ácido benzóico (Gallardo et al., 2006). Durante a embriogênese somática em milho, o ácido cinâmico estimulou o sistema antioxidante de plantas contra espécies reativas de oxigênio (ROS) através de enzimas antioxidantes como dismutases do superóxido (SOD) e peroxidases (POD), aliviando as consequências do estresse e possibilitando o desenvolvimento dos embriões somáticos (Szalai e Janda, 2009).

Plantas de *B. distachyon* regeneradas a partir de CE com até 240 dias foram analisadas por citometria de fluxo para avaliação da estabilidade de suas quantidades de DNA. O coeficiente de variação das amostras foi inferior a 5%, como proposto por Galbraith et al. (2001) para validação da análise. *B. distachyon* apresentou média de conteúdo nuclear $2C = 0,72$ pg DNA (diploide), valores similares aos relatados por Draper et al. (2001), $2C = 0,65$ pg e Filiz et al. (2009), $2C = 0,70$ pg. A maioria das plantas analisadas por citometria de fluxo manteve o nível de ploidia das plantas doadoras como, por exemplo, toda a população oriunda de CE com 60, 150 e 240 dias. Os resultados mostram que a frequência de poliploides não está relacionada com o tempo de cultivo in vitro uma vez que foram observadas plantas poliploides em praticamente todas as idades avaliadas. Além disso, 100% das plantas regeneradas eram diploides tanto na menor idade (60 dias) quanto na maior idade avaliada (240 dias). Por outro lado, é necessário considerar que a redução da taxa regenerativa, provavelmente causada pelo aumento da idade dos CE, o que pode ter contribuído para que plantas com alterações genéticas ou outra alteração não chegassem ao fim do processo de embriogênese e, conseqüentemente, não gerassem uma planta completamente desenvolvida, passível de análises. Nontaswatsri e Fukai (2005), em trabalho com CE mixoploides de *Dianthus hybrida* 'Telstar Scarlet', submetidos a sucessivos subcultivos, também observaram que as células diploides têm maior capacidade de regeneração.

Um dos principais requisitos para o sucesso da embriogênese somática é a fidelidade clonal, constituindo também o maior requisito para a clonagem em grande escala. A avaliação da estabilidade de genótipos de interesse quanto ao nível de ploidia garante aos tecidos embriogênicos a manutenção da capacidade de produzirem embriões e plântulas com a mesma quantidade de DNA da planta doadora (De Verno 1995; Currais et al., 2013). Corredoira et al. (2014) enfatizaram a importância 'true-to-type' do material vegetal a ser clonado. É sabido que a manutenção de CE indiferenciados aumenta os riscos de instabilidade genética (Karp, 1994; Corredoira et al., 2014), e a sua propagação pode depender do tipo e concentração dos reguladores de crescimento

aplicados (Mishiba et al., 2001; Currais et al., 2013) e a duração do cultivo in vitro (Fras e Maluszynska, 2004; Currais et al., 2013).

Com base nos resultados observados, conclui-se que as idades de 60 e 90 dias são as mais promissoras para regeneração de plantas de *B. distachyon*, enquanto que calos mais velhos (a partir de 120 dias) não são indicados, visto que há perda gradativa da capacidade regenerativa, sendo a formação de regiões embriogênicas e a capacidade regenerativa as características que mais contribuem para essa diferença. Além disso, a queda na capacidade regenerativa é acompanhada por uma diminuição na quantidade de metabólitos ativos em EE a partir dos 120 dias. Sugere-se que ácido aspártico, asparagina, triptofano, glicina e mio-inositol-P são marcadores da embriogênese e aquisição da competência embriogênica em *B. distachyon*. Observou-se, ainda, que não houve relação entre tempo de cultivo e o percentual de plantas poliploides.

Referências

- Abbasi BH, Ali H, Yücesan B, Saeed S, Rehman K, Khan MA (2016) Evaluation of biochemical markers during somatic embryogenesis in *Silybum marianum* L. *3 Biotech* 6(1): 1-8. doi:10.1007/s13205-016-0366-1
- Abid G, Silue S, Muhovski Y, Jacquemin JM, Toussaint A, Baudoin JP (2009) Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *Gene*, 439 (1-2):1-10. doi:10.1016/j.gene.2009.03.007
- Abreu IS, Carvalho CR, Clarindo WR (2008) Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Rep* 27(7):1227-1233. doi:10.1007/s00299-008-0539-4
- Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* 4(5): 638-649. doi:10.1038/nprot.2009.30
- Azevedo RA, Lancien M, Lea PJ (2006) The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids* 30(2): 143-162. doi:10.1007/s00726-005-0245-2
- Bablak P, Draper J, Davey MR, Lynch PT(1995) Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 42(1): 97-107. doi:10.1007/BF00037687
- Betekhtin A, Rojek M, Milewska-Hendel A, Gawecki R, Karcz J, Kurczynska E, Hasterok R (2016) Spatial distribution of selected chemical cell wall components in the embryogenic callus of *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* 11(11): 1-20. doi:10.1371/journal.pone.0167426
- Bragg JN, Anderton A, Nieu R, Vogel JP (2015) *Brachypodium distachyon*. In: Wang K (ed) *Agrobacterium Protocols*. 3rd edn. Springer, New York, pp.17-33.
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T (2009) *Embryogenesis: Pattern formation from a single cell* (ed) *Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, pp. 1-28.
- Corredoira E, Toribio M, Vieitez AM (2014) Clonal propagation via somatic embryogenesis in *Quercus* spp. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, Ahuja MR (eds) *Tree biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, pp 264-302. doi:10.1201/b16714-13

Cruz CD (2013) GENES – A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci* 35(3): 271-276. doi:10.4025/actasciagron.v35i3.21251

Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H, Kusano M, Lisec J, Penã-Cortés H, Willmitzer L, Hannah MA (2009) Target search a bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* 10:1-12. doi:10.1186/1471-2105-10-428

Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 114(2): 149-159. doi:10.1007/s11240-013-0311-5

De Verno LL (1995) An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (ed) *Somatic embryogenesis in woody plants*, 1st edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 361-377.

De-La-Peña C, Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, Avilez-Montalvo R, Loyola-Vargas VM (2015) The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Front Plant Sci* 6: 1-15. doi:10.3389/fpls.2015.00635

Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 127(4): 1539-1555. doi:10.1104/pp.010196

Fehér A (2015) Somatic embryogenesis stress induced remodeling of plant cell fate. *BBA-Gene Regul Mech* 1849(4): 385-402. doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.005

Filiz E, Ozdemir BS, Budak F, Vogel JP, Tuna M, Budak H (2009) Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome* 52(10): 876-890. doi:10.1139/g09-062.

Fras A, Maluszynska J (2004) The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* 121(2): 145-154. doi:10.1023/B:GENE.0000040375.18684.82

Galbraith D, Lambert G, Macas J, Doležel J (2001) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: Robinson J, Darzynkiewicz Z, Dean P, Hibbs A, Orfão A, Rabinovitch P, Wheelless L (eds) *Curr Protoc Cytom*. Wiley, New York, pp 1-22. doi:10.1002/0471142956.cy0706s02

Gallardo C, Jiménez L, García-Conesa MT (2006) Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem* 99(3): 455-463. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.053

Gao Y, Zhao Y (2014) Auxin Biosynthesis and Catabolism. In: Zažímalová E, Petrasek J, Benková E (ed) Auxin and its role in plant development, Springer, Vienna, pp. 21-38.

Hansen G, Wright MS (1999) Recent advances in transformation of plants. Trends Plant Sci 4(6): 226-231. doi:10.1016/S1360-1385(99)01412-0

Heringer AS, Barroso T, Macedo AF, Santa-Catarina C, Souza GHMF, Floh EIS (2015) Label-free quantitative proteomics of embryogenic and non-embryogenic callus during sugarcane somatic embryogenesis. PLoS ONE 10(6): 1-23. doi:10.1371/journal.pone.0127803

Herrmann KM (1995) The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell 7(7): 907-919. doi:10.1105/tpc.7.7.907

Hirano K, Kondo M, Aya K, Miyao A, Sato Y, Antonio BA, Matsuoka M (2013) Identification of transcription factors involved in rice secondary cell wall formation. Plant Cell Physiol 54(11): 1791-1802. doi:10.1093/pcp/pct122

Igamberdiev AU, Eprintsev AT (2016) Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. Front Plant Sci 7:1-15. doi:10.3389/fpls.2016.01042

International Brachypodium Initiative (IBI) (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. Nature 463: 763-768. doi:10.1038/nature08747

Jespersen D, Yu J, Huang B (2015) Metabolite responses to exogenous application of nitrogen, cytokinin, and ethylene inhibitors in relation to heat-induced senescence in Creeping Bentgrass. PLoS ONE 10(3): 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0123744

Karp A (1994) Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) Plant Cell Tissue Culture, Kluwer, Dordrecht, pp 139-151.

Kellogg EA (2015). Description of the family, vegetative morphology and anatomy. In: Kellogg EA (ed) The families and genera of vascular plants: Flowering Plants. Monocots, Poaceae, Springer, New York, pp 3-23.

Khan MA, Abbasi BH, Ali H, Ali M, Adil M, Hussain, I (2015) Temporal variations in metabolite profiles at different growth phases during somatic embryogenesis of *Silybum marianum* L. Plant Cell Tiss Organ Cult 120(1): 127-139. doi:10.1007/s11240-014-0587-0

- Kim YS (2002) Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J Biochem Mol Biol* 35(5): 443-451. doi:10.5483/BMBRep.2002.35.5.443
- Lee MB, Jeon WB, Kim DY, Bold O, Hong MJ, Lee YJ, Park JH, Seo YW (2011) Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21 with two binary vectors containing hygromycin resistance and GUS reporter genes. *Crop Sci Biotechnol* 14 (4): 233-238. doi:10.1007/s12892-011-0080-9
- Lema-Rumińska J, Śliwińska E (2015) Evaluation of the genetic stability of plants obtained via somatic embryogenesis in *Chrysanthemum × grandiflorum*. *Acta Sci Pol-Hortoru* 14(3):131-139.
- Luo Y, Qin G, Zhang J, Liang Y, Song Y, Zhao M, Qu L-J (2011). d-myo-Inositol-3-phosphate affects phosphatidyl inositol-mediated endomembrane function in *Arabidopsis* and is essential for auxin-regulated embryogenesis. *Plant Cell* 23(4): 1352-1372. doi:10.1105/tpc.111.083337
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 1:387-396. doi:10.1038/nprot.2006.59
- Lysák MA, Doležel J (1998) Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 52(2): 123-132. doi:10.1080/00087114.1998.10589127.
- MagnaVal C, Noirot M, Verdeil JL, Blattes A, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Mo J (1995) Free amino acid composition of Coconut (*Cocos nucifera* L.) calli under somatic embryogenesis induction conditions. *J Plant Physiol* 146(1-2): 155-161. doi:10.1016/S0176-1617(11)81982-6
- Mishiba K, Okamoto T, Mii M (2011) Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Physiol Plant* 112(1):142–148. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1120119.x
- Mur LA, Allainguillaume J, Catalán P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel J (2011) Exploiting the *Brachypodium* tool box in cereal and grass research. *New Phytol* 191(2): 334-347, 2011. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03748.x
- Nadwodnik J, Lohaus G (2008) Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227(5): 1079-1089. doi:10.1007/s00425-007-0682-0

Nascimento-Gavioli MCA., Cangahuala-Inocente GC, Steinmacher D, Ree JF, Steiner N, Guerra MP (2017) Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 1:1-8. doi:10.1007/s11627-017-9805-x

Ng TLM, Karim R, Tan YS, Teh HF, Danial AD, Ho LS (2016) Amino acid and secondary metabolite production in embryogenic and nonembryogenic callus of fingerroot Ginger (*Boesenbergia rotunda*). *PLoS ONE* 11(6): 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0156714

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* 147(3): 1251-1263. doi:10.1104/pp.108.122465

Nontaswatsri C, Fukai S (2005) Regenerative callus of *Dianthus* 'Telstar Scarlet' showing mixoploidy produce diploid plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 83(3): 351-355. doi:10.1007/s11240-005-6621-5

Otto FJ (1990) DAPI staining of fixed cells for highresolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Robinson JP (ed) *Methods in cell biology*, Academic Press, San Diego,pp. 105-110.

Păcurar DI, Thordal-Christensen H, Nielsen KK, Lenk I (2008) A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Res* 17(5): 965-975. doi:10.1007/s11248-007-9159-y

Pinto DLP, Barros, BA, Viccini, L.F, Campos JMS, Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103(1):71-79. doi:10.1007/s11240-010-9756-y

Rancour DM, Hatfield RD, Marita JM, Rohr NA, Schmitz RJ (2015) Cell wall composition and digestibility alterations in *Brachypodium distachyon* achieved through reduced expression of the UDP-arabinopyranose mutase. *Front Plant Sci*6:1-20. doi: 10.3389/fpls.2015.00446

Rohlf, FJ (1970) Adaptive hierarchical clustering schemes. *Syst Biol* 19(1): 58-82. doi:10.1093/sysbio/19.1.58

San José MC, Corredoira E, Oliveira H (2015) Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 123(3): 489-499. doi:10.1007/s11240-015-0853-9

Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front Plant Sci* 6: 1-11. doi:10.3389/fpls.2015.00656

Singh D (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian J Genet Pl Br* 41(2): 237-245.

Siriwardana S, Nabors MW (1983) Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. *Plant Physiol* 73(1): 142-146. doi:10.1104/pp.73.1.142

Szalai G, Janda T (2009) Effect of salt stress on the salicylic acid synthesis in young maize (*Zea mays* L.) plants. *J Agron Crop Sci* 195(3): 165-171. doi:10.1111/j.1439-037X.2008.00352.x

Tayeh C, Randoux B, Vincent D, Bourdon N, Reignault P (2014) Exogenous trehalose induces defenses in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology* 104(3): 293-305. doi:10.1094/PHYTO-07-13-0191-R.

Trafford K, Haleux P, Henderson M, Parker M, Shirley NJ, Tucker MR, Fincher GB, Burton, RA (2013) Grain development in Brachypodium and other grasses: possible interactions between cell expansion, starch deposition, and cell-wall synthesis. *J Exp Bot* 64(16): 5033-5047. doi:10.1093/jxb/ert292

Verdeil JL, Hoher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferriere N, Nicole M (2001) Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann Bot* 88(1):9-18. doi:10.1006/anbo.2001.1408

Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Trambarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12(6):245-252, 2007. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002

Vogel JP (2015) The rise of Brachypodium as a model system. In: *Genetics and genomics of Brachypodium*, Springer, New York, pp.1-7. doi: 10.1007/7397_2015_14

Vogel JP, Hill T (2008) High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Brachypodium distachyon inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 27(3): 471-478. doi:10.1007/s00299-007-0472-y

Vogel JP, Garvin DF, Leong OM, Hayden DM (2006) Agrobacterium-mediated transformation and inbred line development in the model grass Brachypodium distachyon. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 84(2): 199-211. doi:10.1007/s11240-005-9023-9

- Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, LI J (2015) Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. *PNAS*, 112(15): 4821-4826. doi:10.1073/pnas.1503998112
- Winkelmann T, Ratjens S, Bartsch M, Rode C, Niehaus K, Bednarz H (2015) Metabolite profiling of somatic embryos of *Cyclamen persicum* in comparison to zygotic embryos, endosperm, and testa. *Front Plant Sci* 6:1-11. doi:10.3389/fpls.2015.00597
- Xia J, Mandal R, Snelnikov I, Broadhurst D, Wishart DS (2012) MetaboAnalyst 2.0 - a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* 40(1): 127-133. doi:10.1093/nar/gks374
- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* 37(2): 652-660, 2009. doi:10.1093/nar/gkp356
- Xia J, Snelnikov IV, Han B, Wishart DS (2015) MetaboAnalyst 3.0 – Making Metabolomics More Meaningful”. *Nucleic Acids Res* 43(1): 251-257. doi:10.1093/nar/gkv380
- Ye XG, Tao LL (2008) Research outline on some characteristics of *Brachypodium distachyon* as a new model plant species. *Acta Agron Sin* 34(6): 919-925. doi:10.1016/S1875-2780(08)60032-2
- Yordem BK, Conte SS, Ma JF, Yokosho K, Vasques KA, Gopalsamy S. N, Walker EL (2011) *Brachypodium distachyon* as a new model system for understanding iron homeostasis in grasses: phylogenetic and expression analysis of Yellow Stripe-Like (YSL) transporters. *Ann Bot* 108(5): 821-833. doi:10.1093/aob/mcr200
- Zhao Y (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 61: 49-64. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112308
- Zhao Y (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to Indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant* 5(2): 334-338. doi:10.1093/mp/ssr104
- Zombori Z, Szécsényi M, Györgyey J (2011) Different approaches for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Brachypodium distachyon*, a new model plant for temperate grasses. *Acta Biol Szeged* 55(1): 193-195.

CAPÍTULO 2

Qualidade de luz afeta os teores de lignina e celulose, a expressão de genes de suas rotas de síntese e mecanismos de defesa antioxidativo em *Brachypodium distachyon*

Resumo

A qualidade da luz é percebida pelas plantas através de vários receptores e gera diversas respostas morfológicas, metabólicas e transcricionais. No presente estudo, a expressão de genes da rota de síntese de lignina e celulose, caracteres morfológicos, anatômicos, enzimáticos e químicos foram avaliados em plantas de *Brachypodium distachyon* cultivadas in vitro, sob diferentes qualidades espectrais. Os tratamentos com lâmpadas fluorescente (LF), LED Branca e LED azul (A)/vermelho (V), influenciaram a morfologia de plantas in vitro de *B. distachyon*, agindo em alvos específicos para promover adaptação funcional. As LFs, de uso tradicional em salas de crescimento, promoveram maiores taxas de crescimento, forte deposição de ligninas siringil (S) e guaiacil (G), maiores quantidades de celulose e maiores expressões dos genes CESa4 e CESa7. Os genes PAL1 e F5H1 tiveram maiores níveis de expressão em plantas submetidas à LED A/V do que nas crescidas sob LFs ou LED Branca, enquanto que os demais genes analisados não variaram seus níveis de expressão entre os tratamentos. O gene CESa4 teve sua expressão reduzida sob LED A/V, sendo que nessa qualidade espectral houveram plantas menores, com aumento no teor de lignina total e maior deposição de lignina G em relação à S e menor quantidade de celulose comparado aos demais tratamentos. Sob LED Branca, ambos CESa4 e CESa7 apresentaram expressão reduzida em relação à LF, além do aumento significativo nas atividades das enzimas SOD e CAT. Conclui-se que a qualidade espectral das lâmpadas LEDs alterou os teores de lignina e celulose e a expressão de genes de suas rotas de síntese, além de terem sido observadas alterações anatômicas e em mecanismos de defesa antioxidativa em *B. distachyon*. Esses resultados sugerem que a regulação dos padrões de deposição de parede celular e lignificação respondem a estímulos luminosos.

Palavras-chave: Celulose sintase, diodos emissores de luz, fenilalanina amônia-liase, qualidade espectral.

Abstract

Light quality is perceived by plants through several receptors and generates diverse morphological, metabolic, and gene expression responses. In this study, the expression of lignocellulosic genes, as well as morphological, anatomical, enzymatic, and chemical characteristics, were characterized in *Brachypodium distachyon* plants grown in vitro under different spectral qualities. The treatments with fluorescent lamps (FL), white LED and blue/red (B/R) LED showed different effects on *B. distachyon*, acting on specific targets to promote functional adaptation. The FL, traditionally used in growth rooms (FL), led to higher growth rates, strong deposition of S and G lignins, higher amounts of cellulose, and greater expression of CESa4 and CESa7 genes. PAL1 and F5H1 genes were upregulated in plants submitted to B/R LEDs compared to those grown under FL or white LEDs, while the other analyzed genes did not show changed expression levels among treatments. CESa4 was downregulated under B/R LEDs, spectral quality that led to smaller plants, increased total lignin content, higher deposition of G lignin than S lignin, and decreased total cellulose content compared to the other treatments. In white LED, both CESa4 and CESa7 genes had their expressions lessened when compared to FL, in addition to a significant increase in SOD and CAT activities. The spectral quality of the LED lamps altered the lignin and cellulose contents, the expression of genes of their synthetic routes, as well as anatomical and antioxidative defense mechanisms. These results suggest that light quality regulates cell wall deposition and lignification patterns in *B. distachyon*.

Keywords: Cellulose synthase, LEDs, phenylalanine ammonia-lyase, spectral quality.

Introdução

A plasticidade do desenvolvimento vegetal depende da qualidade e quantidade de luz captada por fotorreceptores (Bischoff et al., 2011; Jung et al., 2013; Huché-Thélier et al., 2016). Além de essencial para fotossíntese, a luz se destaca como um dos principais elicitores abióticos, modulando o desenvolvimento, o potencial morfogênico, a biossíntese de componentes celulares e expressão gênica durante a vida da planta (Ahmad et al., 2016; Huché-Thélier et al., 2016).

O controle de qualidade da luz pode ter importantes implicações na produtividade vegetal e na biossíntese de bioativos úteis (Arena et al., 2016). A luz afeta o nível de atividade antioxidante bem como o conteúdo de fenóis, de flavonoides e de outros metabólitos secundários cuja biossíntese pode ser alterada ao se modificar a proporção de comprimentos de onda de luz (Manivannan, et., 2015; Arena et al., 2016; Batista et al., 2016; Ferreira et al., 2016; Pacheco 2016; Manivannan et al., 2017).

Os componentes da parede vegetal são influenciados pela qualidade da luz. Os pigmentos fotorreceptores, fitocromos e criptocromos regulam e desencadeiam processos bioquímicos e celulares capazes de agir em genes alvos específicos e promover a aclimação funcional (Fankhauser e Staiger, 2002). A biossíntese de lignina pode ser manipulada pelo ciclo de luz (Dong et al., 2015), e a presença da luz permite o ajuste fino para a deposição de celulose, mantendo a estrutura e o crescimento da parede celular (Bischoff et al., 2011).

Brachypodium distachyon (L.) P. Beauv. (Poaceae) é uma espécie modelo importante para gramíneas com interesses para fins alimentícios e energéticos. Sua pequena estatura, rápido crescimento, fácil cultivo, reprodução por auto-fecundação, genoma pequeno e sequenciado, aliado a recursos moleculares e genéticos já elucidados alicerçam o seu uso como planta modelo (Mur et al., 2011; Brkljacic et al., 2011; Kellogg, 2015; Vogel, 2015; Hasterok et al., 2015). No entanto, não há relatos de estudos sobre respostas de plantas de *B. distachyon* crescidas *in vitro*, sob diferentes qualidades de luz.

O cultivo *in vitro* de plantas facilita a manipulação e o controle da composição do meio de crescimento, das trocas gasosas, da qualidade da luz, da irradiância e do fotoperíodo, fatores que afetam o crescimento, a taxa de proliferação, a morfogênese e a anatomia de plantas (Saebo et al., 1995; Alvarenga et al., 2015). A morfogênese *in vitro* modulada pela variação da qualidade de luz já foi estudada em várias espécies, como

Vitis vinifera e *V. ficifolia* (Poudel et al., 2008), *Rosa hybrida* ‘Scarlet’, *Chrysanthemum morifolium* ‘Coral Charm’, e *Campanula portenschlagiana* ‘BluOne’ (Ouzounis et al., 2014), plantas medicinais como *Stevia rebaudiana* (Ahmad et al., 2016) e *Achillea millefolium* (Alvarenga et al., 2015), e gramíneas como trigo (Dong et al. 2015) e arroz (Jung et al., 2013).

LEDs (Light-Emitting Diodes) têm sido usados para diferentes propósitos relacionados ao cultivo de plantas (Gupta e Jatothu, 2013). Seu uso na produção de plantas em grande escala é respaldado pelo baixo custo e alta eficiência na conversão de energia, além de baixa produção de energia térmica (Fang et al., 2000; Fang et al., 2011; Manivannan et al., 2015). Vários aspectos morfológicos, anatômicos e fisiológicos, como o alongamento e formação de brotos (Alvarenga et al., 2015), alterações da morfologia foliar (Ouzounis et al., 2014), rizogênese (Hung et al., 2016), habilidades fotossintéticas (Dong et al. (2015), produção de calos (Ahmad et al., 2015), indução de embriões somáticos (Ferreira et al., 2016) e assimilação de nutrientes (Manivannan et al., 2017) de plantas utilizados *in vitro* demonstraram ser reguladas pelas propriedades espectrais de LEDs.

Notadamente, o ajuste das condições lumínicas com lâmpadas LEDs pode alterar também a produção de compostos bio-ativos de interesse. Jung et al. (2013) relataram alterações na produção de flavonoides em LED Branca, Azul e Vermelha. Batista et al. (2016) descreveram alterações no perfil de óleos essenciais de *Lippia alba* cultivadas em LF, LED Branca e LED A/V. Em *Achillea millefolium* a intensidade e qualidade da luz alteraram a produção de óleos, aumentando monoterpenos em LED Vermelha e sesquiterpenos em LED Verde (Alvarenga et al., 2015). Em *Piper aduncum* LED Azul aumentou óleos essenciais e fenilpropanoides (Pacheco et al., 2016).

Os espectros emitidos pelos LEDs podem causar estresses foto-oxidativos e perturbar o nível de estado estacionário de espécies reativas de oxigênio (ROS), e o sistema de defesa antioxidante (Gupta e Sahoo, 2015). ROS incluem o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produzidos durante o transporte de elétrons por várias vias metabólicas (Dietz 2016a) e, por sua vez, causam danos à biomoléculas tais como lipídeos da membrana, proteínas, pigmentos do cloroplasto, enzimas, ácidos nucleicos e outros (Mishra e Singhal, 1992; Dietz 2016b). *Triticum aestivum* apresentou aumento das atividades de peroxidases (POD) e catalases (CAT) quando cultivados em LED Branca/vermelha (Dong et al., 2015). Em cana-de-açúcar houve maior atividade de peroxidases do ascorbato (APX)

em plantas cultivadas em LED A/V (18/82%) do que em plantas expostas a FL, o que favoreceu na alta taxa de aclimatização (Ferreira et al., 2016). Contudo, até o momento, nada foi relatado sobre os efeitos da FL e LED Branca e A/V no crescimento e desenvolvimento de *B. distachyon*.

O estudo sobre o impacto da qualidade da luz em *in vitro* auxiliará na compreensão das alterações moleculares, anatômicas e antioxidativas, bem como seus efeitos na composição da parede celular durante o desenvolvimento de *B. distachyon*. Portanto, este trabalho tem por objetivo estudar os padrões de expressão de genes envolvidos na biossíntese da parede celular, bem como as possíveis alterações geradas na morfo-fisiologia de plantas em *Brachypodium distachyon in vitro*, sob diferentes qualidades lumínicas.

Material e métodos

Material vegetal

Plantas de *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. ($2n = 10$) oriundas de calos com 90 dias de cultivo foram cultivadas em meio contendo sais de MS (Murashige e Skoog 1962), com 10 g L^{-1} de sacarose e 2 g L^{-1} de Phytigel[®] (Sigma) e subcultivadas mensalmente no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil.

Efeito da qualidade da luz

Segmentos transversais de 1 cm contendo gemas axilares foram excisados e utilizados como explantes. Estes foram transferidos para frascos de vidro de 500 mL com tampas de propileno rígido possuindo orifícios com diâmetro de 10 mm cobertos com membranas hidrofóbicas de $0,45 \mu\text{m}$ de poro (PTFE, Milli Seal[®] AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) que permitem a taxa de troca de CO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Batista et al., 2017). Os explantes foram cultivados em meio básico de MS, 10 g L^{-1} de sacarose e 2 g L^{-1} de Phytigel[®] (Sigma). O pH foi ajustado para 5,8 e o meio esterilizado por autoclavagem a 121°C e 108 kPa durante 20 min.

As culturas foram mantidas a 25°C e fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), providos por três fontes de iluminação: duas lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil); duas lâmpadas LED branca (SMD 100, 18 W, Vilux[®], Vitória, ES, Brasil); e duas lâmpadas LED azul/vermelho (LabPARLL-HR/DB-480, 11,6 W) (LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brasil). A irradiância foi padronizada em $56 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ através de um radiômetro (LI-250A, LI-COR[®] Inc., Lincoln, NE). Os espectros de absorção foram registrados em uma faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm com um espectroradiômetro e o software de sistema de aquisição de dados Ocean Optics Spectra-Suite (Ocean Optics[®], Dunedin, FL). As distribuições espectrais utilizados nos tratamentos são apresentados na Figura 1.

Após 40 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis de crescimento e desenvolvimento (altura, número de perfilhos, número de panículas, número de raízes e massa seca), realizadas análises histoquímicas, avaliação da expressão de genes

relacionados a síntese de parede celular, da atividade de enzimas antioxidantes e quantificação de lignina e celulose.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com três tratamentos e 18 unidades experimentais contendo duas plantas por frascos para obtenção da média. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida de teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), para comparação das médias.

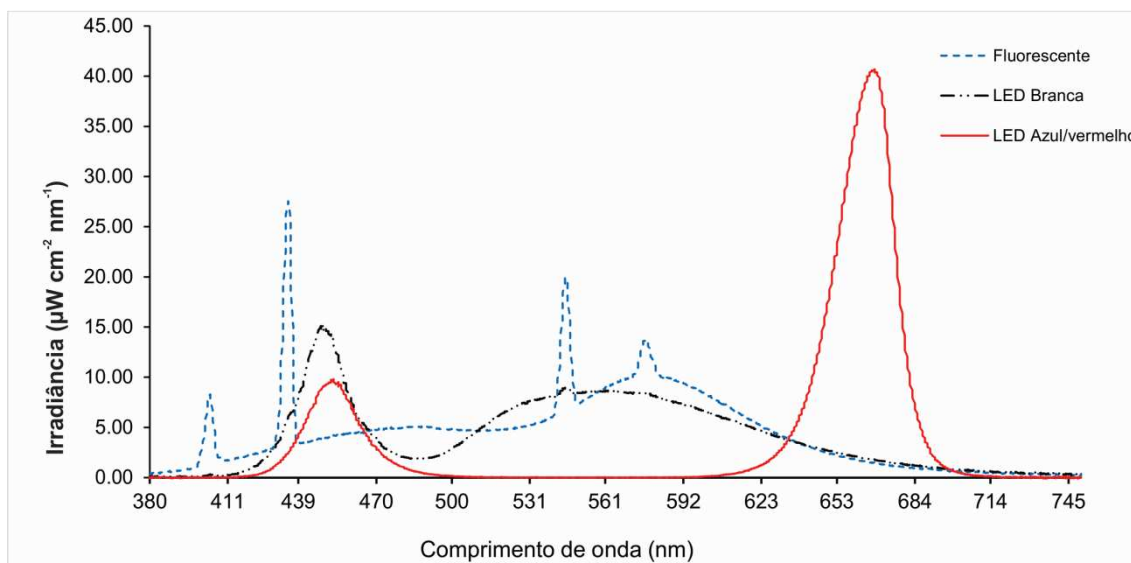


Figura 1 - Emissão espectral absoluta das fontes de luz utilizadas nos experimentos.

Análises histoquímicas

Secções transversais de folhas e caules da região mediana do segundo internódio foram adquiridas com o auxílio de um micrótomo de mesa. Utilizou-se para detectar lignina tipo guaiacil, o método de coloração de Wiesner (floroglucinol-HCl), conforme utilizado por Guo et al. (2001) e Trabucco et al. (2013). As secções foram montadas em floroglucinol a 1% e HCl a 50% e observadas em microscópio. O reagente de Maule (Lewis e Yamamoto, 1990) foi usado para detecção de lignina siringil. Os cortes foram tratados com permanganato de potássio a 1% e HCl a 10%. A montagem e observação em microscópio foram feitas em hidróxido de amônio a 1%.

As imagens foram capturadas utilizando microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, com câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) acoplada ao computador com o

programa de captura de imagens Spot Basic, do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil.

Extração de RNA, síntese de cDNA e análise em RT-qPCR

O RNA total foi isolado utilizando TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e tratado com DNaseI (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) para remover a contaminação do DNA genômico. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA utilizando a Super Script[™] III, First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen[®], Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), seguindo o protocolo do fabricante. Padronizando 1 µg de RNA, foram feitas as sínteses de cDNA.

Pares de primers foram desenhados no site QuantPrimer (<http://www.quantprime.de/>) e os parâmetros foram conferidos nos sites OligoCalc e Oligo Analyzer (<http://www.basic.northwestern.edu/>; www.idtdna.com/). Para avaliação de expressão de genes envolvidos na síntese de lignina e celulose, utilizaram-se pares de primers específicos dos seguintes genes: PAL1, C4H, 4CL1, HCT, C3H, CCR1, F5H1, CAD (Figura 2), CESa4 e CESa7 (Dados suplementares). Para cada combinação de primers, foi realizada a otimização da reação usando um pool dos cDNAs. Ao final de 40 ciclos, a análise da curva de melting foi corrida.

Realizou-se qRT-PCR em aparelho de detecção de CFX96 Touch[™] (BIO-RAD), utilizando SYBR Green I (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA). O perfil de expressão gênica foi normalizado para o nível de expressão de BdGAPDH (glicerol-3-fosfato desidrogenase), como sugerido por Hernando-Amado et al. (2012). Para a espécie os valores de expressão foram calculados utilizando os níveis de $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak e Schmittgen 2001), com 3 repetições biológicas e as médias foram comparadas usando o teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), valores expressos em relação a luz fluorescente.

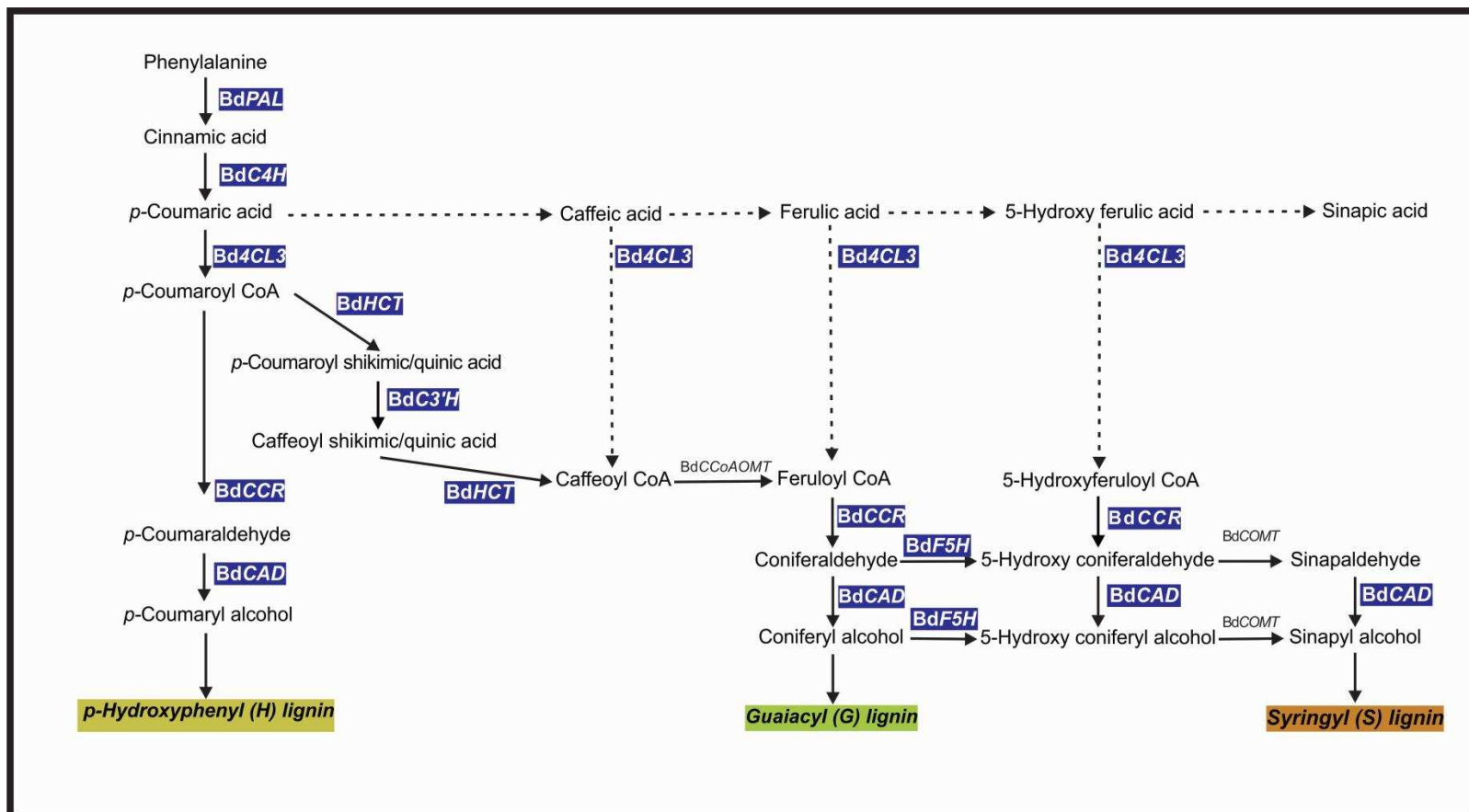


Figura 2 - Resumo da rota de biossíntese de monolignóis de lignina a partir dos quais três monômeros de álcool hidroxicinâmico, que originam as subunidades de p-hidroxifenilo (H), guaiacil (G) e siringil (S). Abreviações: **PAL1** - Fenilalanina amônia-liase 1, **C4H** - Cinamato4-Hidroxilase, **4CL1** - 4-cumarato CoA ligase 1, **HCT**- p-hidroxicinamoil - CoA, **C3H** - 4-Hidroxicinamato 3-hidroxilase, **CCoAOMT** - Caoleoil CoA O-metiltransferase, **CCR1** - Hidroxicinamoil COA redutase, **F5H1** - Ferulato-5-hidroxilase 1, **COMT** - ácido cafeico O-metiltransferase e **CAD** - Cinamil álcool desidrogenase. Genes destacados em caixas azuis foram alvos de análise de expressão por qRT-PCR.

Atividade de enzimas antioxidativas

Foram avaliadas as atividades da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX). Para a obtenção do extrato enzimático, realizou-se a homogeneização de 50 mg de material fresco congelado com 1 mL do meio de extração composto por 0,1M tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 1 mM PMSF e 1% PVPP (p/v). Foi realizada a centrifugação (17000 x g, 15 min), e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto. Todas as etapas foram realizadas a 4 °C.

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático a 200 µL de meio de reação (50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 12,5 mM H₂O₂) (Havir e McHale 1987). O decréscimo da absorbância a 240 nm foi monitorado durante 1 min, e a atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 36 M cm⁻¹. A atividade da SOD foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático em 200 µL de meio de reação (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,8, 13 mM metionina, 75 µM azul p-nitrotetrazólio, 0,1 mM EDTA e 2 µM riboflavina) (Del Longo et al. 1993). As amostras foram iluminadas com lâmpadas de 15 W por 5 minutos, em seguida quantificada pela leitura da absorbância a 560 nm. O branco foi obtido nas mesmas condições, mas na ausência de luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich 1971). A atividade da APX foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático em 200 µL do meio de reação (50 mM fosfato de potássio pH 7,0, 0,8 mM ácido ascórbico e 1,0 mM H₂O₂). O decréscimo na absorbância a 290 nm foi acompanhado durante 2 min. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM cm⁻¹ (Nakano e Asada 1981).

Análises da composição da parede celular

Isolamento da parede celular

A extração de parede celular foi realizada de acordo com Van Acker et al. (2013). Amostras com aproximadamente 10 mg de material liofilizado foram submetidas a uma série de extrações sequenciais e permaneceram por 30 min nos seguintes solventes: água ultrapura (98 °C), etanol (76 °C), clorofórmio (59 °C) e

acetona (54 °C). Entre um solvente e outro foi realizada a centrifugação (17000 x g, 3 min) e remoção do sobrenadante. Ao final da extração com acetona, as amostras foram secas em evaporador rotativo à vácuo por 3 h. O resíduo de parede celular foi utilizado para as quantificações de lignina e celulose

Lignina

O teor de lignina foi determinado pelo método acetil-brometo. Alíquotas de 6 mg de parede celular foram incubadas por 30 min a 70 °C e 750 rpm com 100 µL de solução acetil-brometo 25% (v/v) em ácido acético e 4 µL de ácido perclórico 60%. As amostras foram centrifugadas (17000 x g, 15 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O precipitado foi lavado com 500 µL de ácido acético e centrifugado (17000 x g, 3 min). Os sobrenadantes foram combinados e a eles foram adicionados 200 µL de 2M NaOH. O volume final foi ajustado para 2 mL com ácido acético. O teor de lignina foi determinado pela leitura da absorbância a 280 nm e o coeficiente específico foi de 17,75g (Vogel 2008; Foster et al., 2010a).

Celulose

A extração dos carboidratos da parede celular foi feita de acordo com a metodologia proposta por Foster et al. (2010b). Alíquotas de 6 mg de parede celular foram incubadas com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) a 2 M, por 2 h a 99 °C. Após centrifugação (3000 x g, 2 min), o precipitado resultante foi lavado três vezes com água ultrapura e duas vezes com acetona e, em seguida, seco em evaporador rotativo à vácuo. Esse resíduo foi incubado com 150 µL de H₂SO₄ e 30 µL de 5% fenol (p/v) por 1 h, a 90 °C e 500 rpm. Após centrifugação (17000 x g, 3 min), o sobrenadante foi diluído e a quantidade do teor de celulose foi obtida medindo-se a absorbância a 493 nm, segundo Van Acker et al. (2013).

Resultados

A qualidade de luz influenciou na altura das plantas de *Brachypodium distachyon* cultivadas in vitro

O espectro de luz LED A/V causou uma diminuição significativa na altura das plantas de *Brachypodium distachyon* (Tabela 1). Para as variáveis número de perfilhos, florescimento, raiz e acúmulo de massa de matéria seca não houve efeito significativo.

Tabela 1 - Crescimento e desenvolvimento de *Brachypodium distachyon*, após 40 dias de cultivo in vitro, sob diferentes qualidades de luz

Condição de Luz	Altura (cm)	Número de Perfilhos	Número de Panículas	Número de Raízes	Matéria seca (mg)
Luz Fluorescente	8,5	5,7	2,7	5,5	91,8
LED Branca	9,5	4,7	1,6	5,2	68,48
LED Azul/vermelha	4,6*	5,0	1,0	4,2	64,63

Médias seguidas de asterisco diferem do controle (Luz fluorescente), conforme teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

LED Branca estimulou o sistema antioxidante em *Brachypodium distachyon*

As atividades da SOD e CAT aumentaram significativamente em LED Branca em relação ao controle (Figura 3A- B). Na atividade da peroxidase do ascorbato (APX) não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 3C).

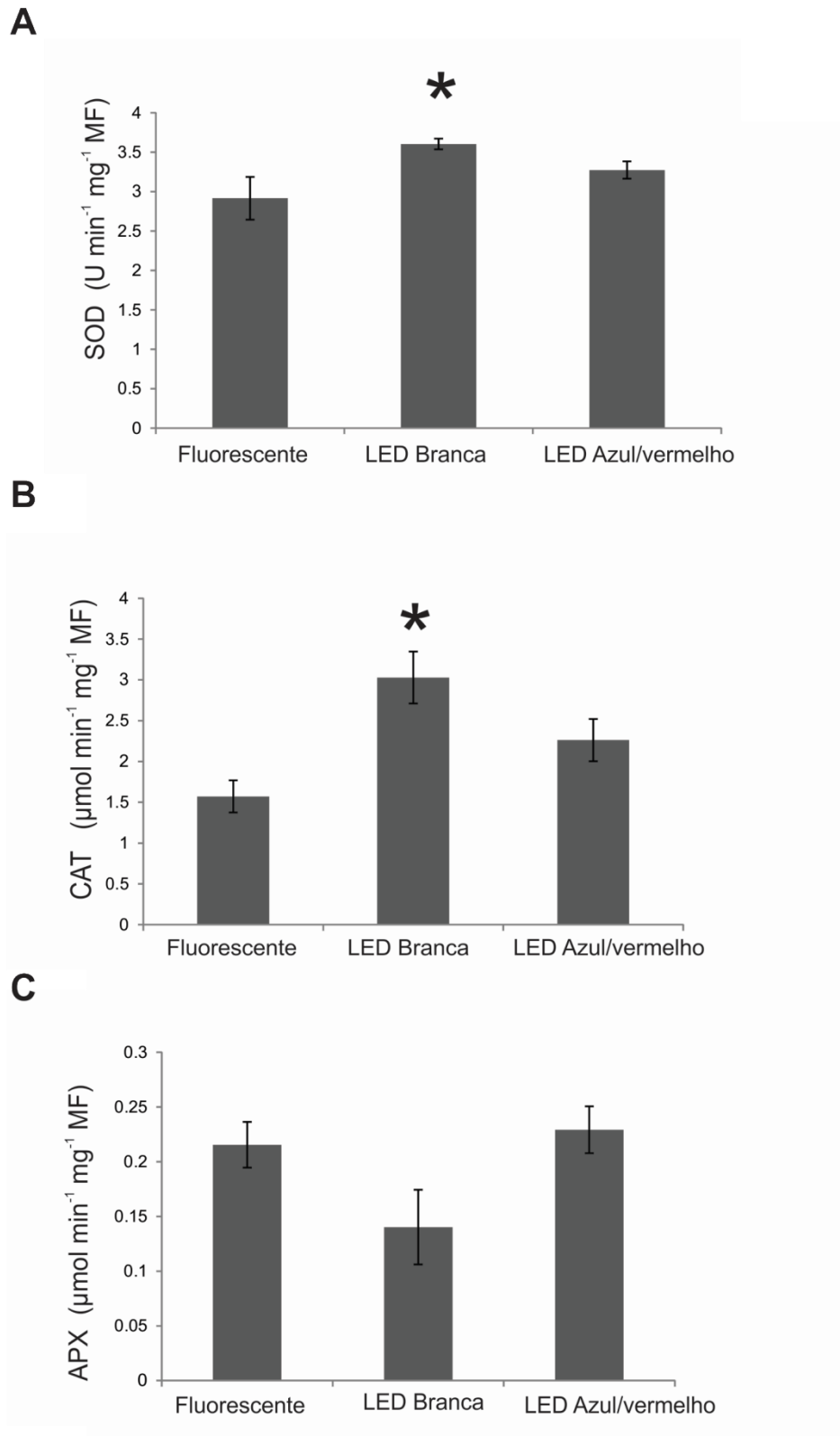


Figura 3 - Atividade de enzimas do sistema antioxidante em *Brachypodium distachyon*. **A** - dismutase do superóxido (SOD). **B** - catalase (CAT). **C** - peroxidase do ascorbato (APX). Médias com asterisco são significativamente diferentes do controle (Luz fluorescente), conforme Teste Dunnett a 5% de probabilidade.

Qualidade de luz afetou a anatomia em *Brachypodium distachyon*

A fim de examinar as potenciais alterações na morfologia dos tecidos vasculares e composição de lignina, tecidos de *B. distachyon* foram corados tanto com floroglucinol (teste Wiesner) como pelo reagente de Maule (Figura 4) observadas sob microscopia de luz. Explantes submetidos à luz LED A/V apresentaram uma formação incipiente de caule, impossibilitando a análise histoquímica dos mesmos.

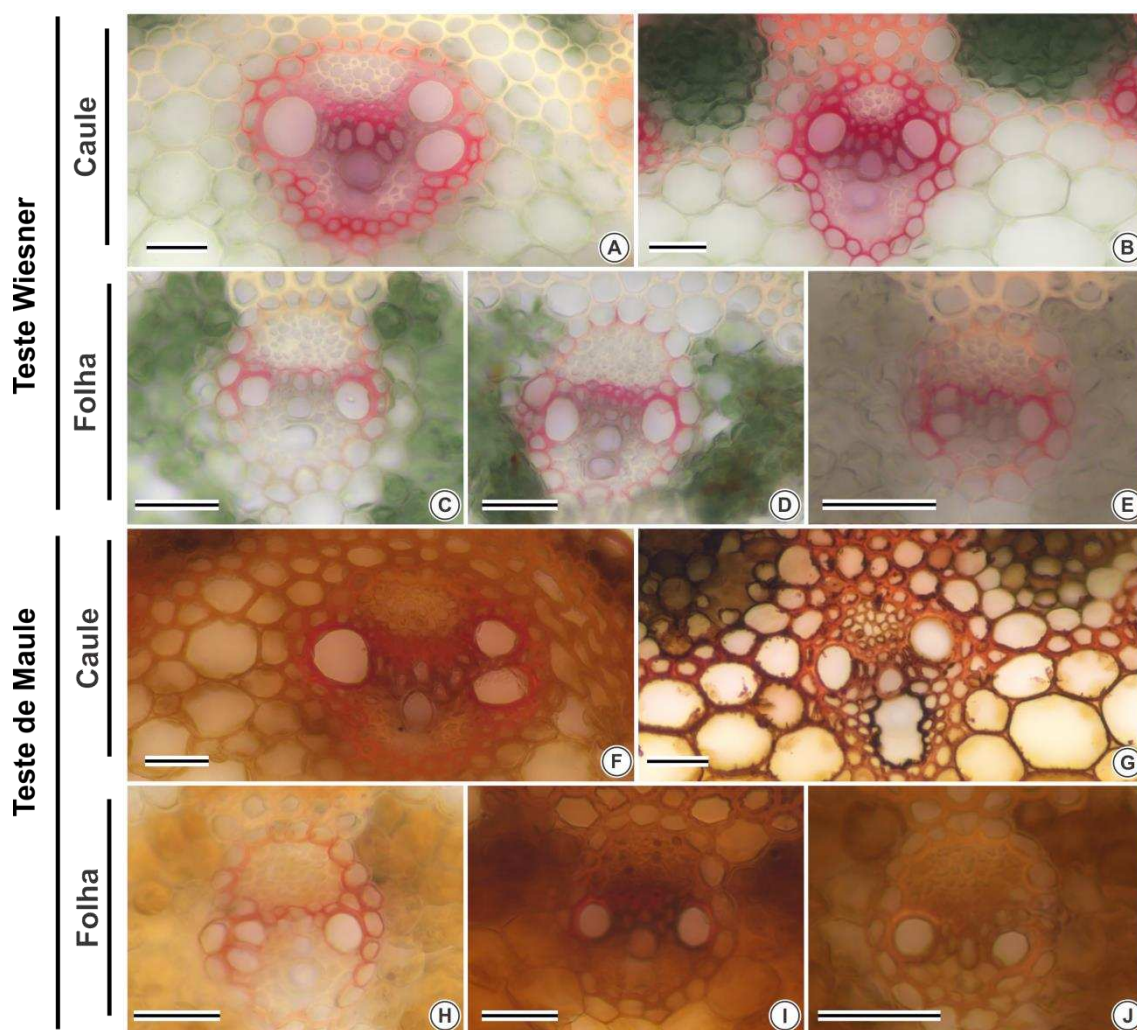


Figura 4 – Análise histoquímica para detecção de lignina em *Brachypodium distachyon* in vitro. Caule e folha em LED Branca (A e C); folha em LED Azul/vermelho (D); caule e folha em luz fluorescente (B e E) coradas com floroglucinol. Secções coradas com reagente de Maule, caule e folha em LED Branca (F e H); folha em LED Azul/vermelho (I); caule e folha em luz fluorescente (G e J). Barras = 5 µm.

Caules de plantas em luz fluorescente (LF) e LED Branca apresentaram diferenças na composição da lignina acumulada, tanto G quanto S, bem como diferenças anatômicas nos arranjos de tecidos. Sob LF houve deposição de lignina nas fibras interfasciculares e bainha do feixe vascular no caule (Figura 4-B e E). Sob LED Branca, os feixes vasculares apresentaram menor coloração e aumento da região de parênquima interfascicular (Figura 4-A e C). Nas folhas, houve variação na região de deposição de lignina entre explantes cultivados sob LF comparativamente à LED A/V. A deposição de lignina em LF concentrou na conexão dos elementos do xilema (Figura 4-E). Em LED A/V houve a deposição em todo feixe vascular (Figura 4-D).

O corante de Maule permitiu destacar os feixes vasculares e fibras interfasciculares. Em luz LED Branca, a lignina S concentrou nos feixes vasculares (Figura 4-F e H). Em folhas, não houve deposição de lignina S detectável em tratamentos mantidos sob LF (Figura 4-J) e LED A/V (Figura 4-I). A coloração amarronzada mostra a ausência de lignina S na região do esclerênquima polar e interfascicular.

LED A/V aumentou o teor de lignina e diminuiu o teor de celulose em plantas de *Brachypodium distachyon* cultivadas in vitro

Os teores de lignina e celulose analisados quimicamente foram avaliados para as três qualidades de luz. Não foram observadas diferenças estatísticas nas proporções desses compostos em plantas submetidas a LF e LED Branca. Plantas submetidas à LED A/V apresentaram menor porcentagem de celulose e maior teor de lignina diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 5).

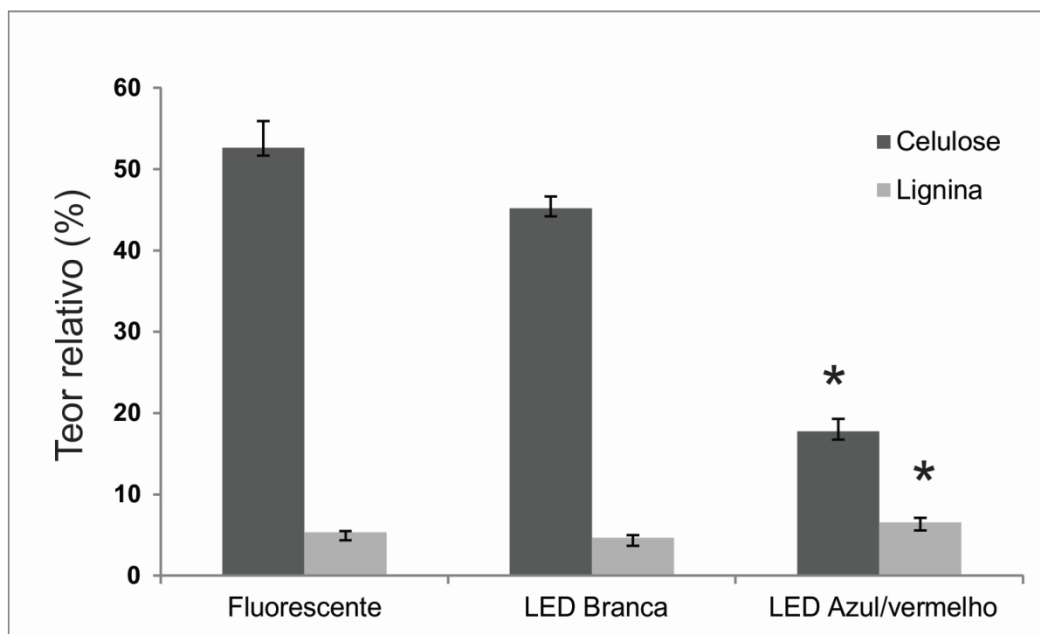


Figura 5 – Teores de lignina e celulose em plantas de *Brachypodium distachyon* sob diferentes qualidades de luz. Médias com asterisco são significativamente diferentes do controle (Luz fluorescente), conforme Teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Qualidade de luz alterou níveis de expressão de genes de síntese de lignina e celulose em *Brachypodium distachyon*

A expressão de genes da rota de síntese da lignina e celulose em *Brachypodium distachyon* foi influenciada pelas diferentes qualidades da luz. Foi observada a expressão significativamente aumentada de PAL1 e FH51 em plantas cultivadas sob LED A/V, enquanto que CESa4 apresentou nível de expressão reduzido em lâmpadas LED Branca e LED A/V, comparado com LF. CESa7 também mostrou redução no nível de expressão em LEDs. No entanto, essa diminuição só foi significativa em LED Branca (Figura 6).

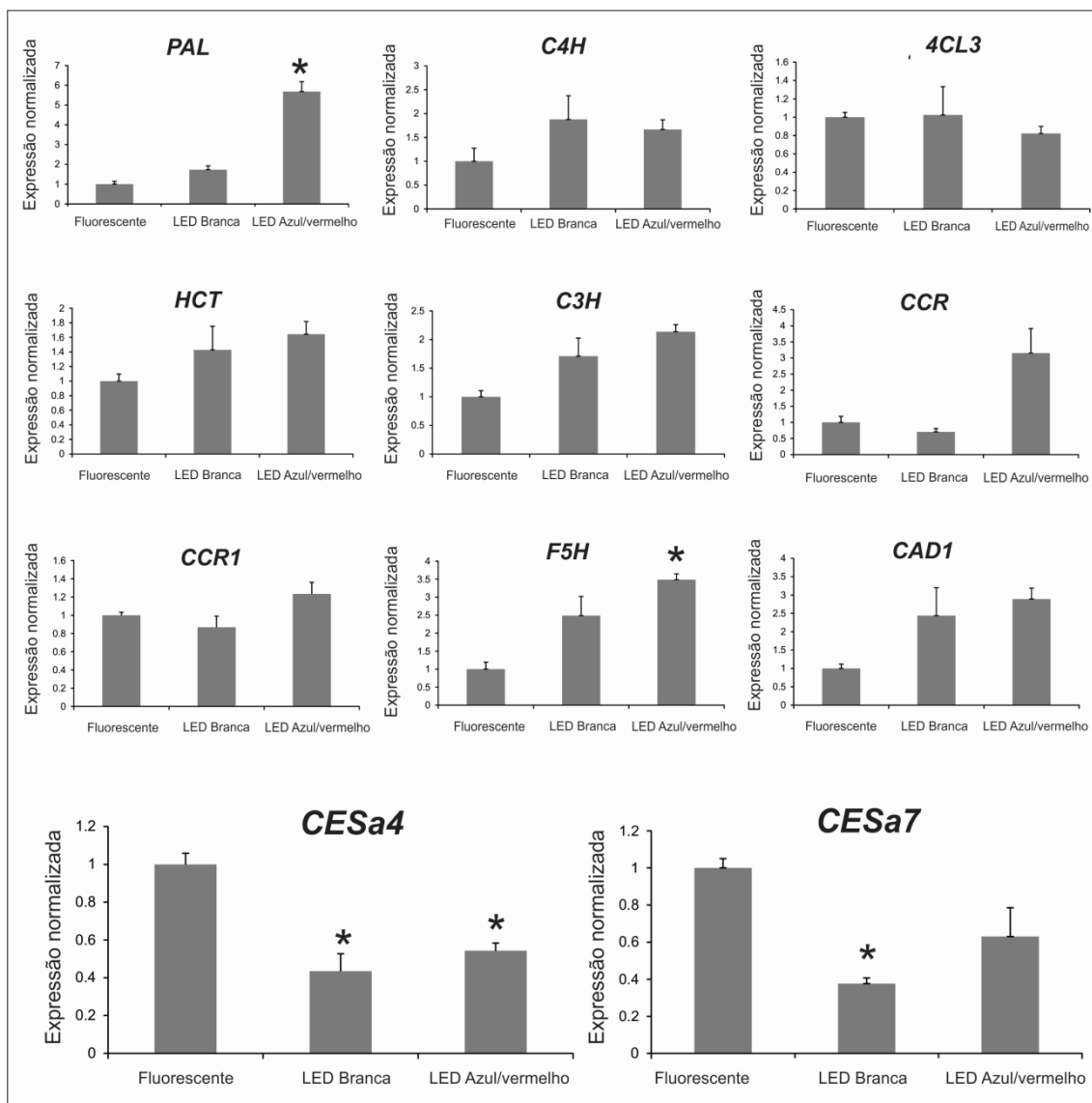


Figura 6 - Expressão relativa dos genes da via de síntese de lignina (**PAL1** - Fenilalanina amônia-liase 1, **C4H** - Cinamato4-hidroxilase, **4CL1** - 4-cumarato CoA ligase 1, **HCT** - p-hidroxicinamoil - CoA, **C3H** - 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase, **CCR1** - Hidroxicinamoil COA redutase, **F5H1** - Ferulato-5-hidroxilase 1, **CAD** - Cinamil álcool desidrogenase) e genes relacionados à síntese de celulose (**CESa4** - Celulose-sintase 4 e **CESa7** - Celulose-sintase 7) em plantas de *Brachypodium distachyon*, após 40 dias de cultivo in vitro sob luz fluorescente, LED Branca e LED Azul/Vermelho. Expressão normalizada relativa a BdGAPDH. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3), * p < 0,05 pelo teste de Dunnett.

Discussão

As plantas desenvolveram diversas estratégias para lidar com ambiente de estresse (Das Marais et al., 2015), e respondem à luz de maneira variável e genótipo dependente (Zienkiewicz et al., 2015). O ajuste à qualidade luz é um sinal importante para o desenvolvimento e elaboração da arquitetura das plantas e morfogênese (Jung et al., 2013; Wang et al., 2015; Alvarenga et al., 2015; Dong et al., 2015; Zienkiewicz et al., 2015; Batista et al., 2016; Hung et al., 2016; Ferreira et al., 2016; Manivannan et al., 2017). No presente estudo, as diferentes qualidades de luz induziram mudanças na expressão de genes da rota da lignina e celulose, na atividade de enzimas do sistema antioxidativo, na deposição de lignina e celulose e no seu teor total, e altura das plantas de *B. distachyon* cultivadas in vitro. Esses resultados sugerem que padrões de deposição de parede celular e lignificação podem ser regulados por estímulos luminosos.

As diferenças na qualidade espectral da luz afetaram o crescimento e desenvolvimento das plantas de *B. distachyon* in vitro. Plantas cultivadas sob luz LED A/V apresentaram menor altura e colmos pouco desenvolvidos. Plantas em LED Branca desenvolveram normalmente comparadas à LF. Nossos resultados corroboram com os relatados para *Rosa hybrida* ‘Scarlet’, *Chrysanthemum morifolium* ‘Coral Charm’ e *Campanula portenschlagiana* ‘BluOne’ em que LED A/V reduziu a altura das plantas (Ouzounis et al., 2014), e LED Azul reduziu a altura e diâmetro do caule *Dianthus caryophyllus* cultivar ‘Purple Beauty’ (Manivannan et al., 2017). A LED Vermelha tem sido relatada como promotora de crescimento. Em *Vitis* sp. causou alongamento dos entrenós (Poudel et al., 2008), também observado em *Vaccinium corymbosum* (Hung et al., 2016), *Rehmannia glutinosa* (Manivannan et al., 2015) e *Dianthus caryophyllus* cultivar ‘Green Beauty’ (Manivannan et al., 2017).

Sinais de luz regulam diferencialmente a atividade da enzima PAL, que estimula o acúmulo de metabólitos secundários (Zhan et al., 2012). No presente trabalho, o aumento significativo na expressão do gene PAL1 em LED A/V se destaca como um dos pontos de regulação da rota de síntese da lignina em resposta à qualidade espectral, sendo que o aumento de expressão desse gene induziu aumento no teor total de lignina. Em *Dianthus caryophyllus* in vitro, LED Vermelha aumentou significativamente a atividade da enzima PAL e menores níveis de atividade foram encontrados em FL (Manivannan et al., 2017). Alterações nos genes iniciais do metabolismo do fenilpropanoides como PAL e C4H, envolvidos em processos importantes além da

lignificação, conduzem a efeitos pleiotrópicos e podem ser utilizados para a melhoria da digestibilidade da celulose (Ralph et al., 2004b). Em *B. distachyon* a redução da expressão de PAL reduziu o conteúdo de lignina total e ferulatos, aumentou a razão da composição S/G e a sacarificação, causando retardamento no desenvolvimento e redução do sistema radicular (Cass et al., 2015).

Nas análises histoquímicas utilizou-se do teste de Wiesner que cora os grupos finais de hidróxi-cinamaldeído, principalmente como grupos finais de coniferaldeído na cor púrpura-avermelhado, enquanto o teste Maule cora o núcleo siringil (S) na cor rosa (células no processo de lignificação) ou vermelha (células lignificadas), e ao corar núcleos guaiacil (G) produz uma cor castanho claro (no processo da lignificação) a castanho escuro (células lignificadas) (Bland, 1966; Wardrop, 1981; Nakano e Meshitsuka, 1992; Lin e Danse, 1992; Vargas et al., 2016). A coloração para lignina S (Reagente Maule) em LED A/V foi pouco intensa e no Wiesner que cora lignina G, apresentou maior intensidade de cor em *B. distachyon*.

A maior expressão de F5H1 em LED A/V pode estar diretamente ligada aos resultados histoquímicos encontrados. F5H é uma monoxigenase dependente de citocromo P450 que catalisa a hidroxilação irreversível do ácido ferúlico em coniferaldeído e álcool coniferílico nas vias que conduzem o ácido sinápico em direção à produção da unidade de lignina S (Kim et al., 2006; Meyer et al., 1998; Vanholme et al., 2008). F5H é alvo de estudos, pois, além de precursor da lignina S, também origina outros metabólitos e ésteres sinápicos, incluindo a 5-hidroxi-guaiacil (Meyer et al., 1998; Ralph et al., 2004b; Vanholme et al., 2010).

Em *B. distachyon*, quando submetido à LED A/V, foi detectado o aumento na expressão de F5H1, além do aumento do teor de lignina G, sugerindo que o próximo gene da rota (COMT) foi regulado negativamente. Em *Arabidopsis thaliana* a superexpressão de F5H e a baixa regulação de COMT aumentaram as proporções de álcool 5-hidróxi-coniferil (o precursor de 5-hidróxi-guaiacil) em 70% na lignina e gerou o fenótipo de nanismo e macho-esterilidade (Vanholme et al., 2010; Weng et al., 2010). Em *B. distachyon*, sugere-se que houve o aumento das unidades de 5-hidróxi-guaiacil no pool de monolignóis advindo da incorporação do álcool coniferílico que, por sua vez, limitou a capacidade de produzir o álcool sinápico e, por conseguinte a lignina tipo S (Ralph et al. 2001; Ralph et al., 2004 b; Lu et al., 2010; Vanholme et al., 2012).

Apesar de somente PAL1 e F5H1 terem variado significativamente, os demais genes da rota apresentaram comportamento de expressão similar, sugerindo um padrão

de co-expressão dessa rota em *B. distachyon*. Muitos genes envolvidos na formação de celulose, hemiceluloses e lignina em *Arabidopsis* e em mais sete espécies, entre elas o arroz, são co-expressos (Ruprecht e Persson, 2012). PALs são comuns em plantas terrestres e catalisam a formação dos fenilpropanoides (Bagal et al., 2012). O gene PAL catalisa o passo inicial para a síntese de monolignóis, além de possuir co-expressão com C4H, 4CL, HCT, C3H, CCoAOMT e CCR (Tohge e Fernie, 2010; Ruprecht e Persson, 2012).

Além disso, trabalhos já mostraram que muitos genes envolvidos na síntese de xilanas e ligninas foram co-expressos com as CESas de parede secundária (Brown et al., 2005; Brown et al., 2011). Os genes CESas são regulados pelos fitocromos (Bischoff et al., 2011), modificando a síntese de celulose. As diferentes qualidades de luz alteram o conteúdo lignocelulósico em *B. distachyon* in vitro, devido as diferentes regiões espectrais ativarem fotorreceptores que induzem a expressão de genes com percepção e sinalização compartilhada (Lin 2002; Fankhauser e Staiger, 2002; Huché-Thélier et al., 2016). A diminuição na expressão dos genes CESa4 e CESa7 em *B. distachyon* resultou em plantas com redução na área do caule, na deposição de parede secundária e no teor de celulose (Handakumbura et al., 2013), características estas similares às observadas nesse estudo em plantas cultivadas sob LED A/V, em que a expressão de CESa4 foi reduzida e também o teor de celulose. Adicionalmente, em arroz, a alteração na estrutura conformacional de CESa4 reduziu o nível de celulose levando a formação de estrutura de parede secundária anormal (Zhang et al., 2009). Em LED Branca, a redução significativa na expressão de CESa4 e CESa7 não acarretou em diferenças no teor de celulose total. Petrik et al. (2016), usando promotores para expressão na parede secundária observaram que CESa7 é fortemente expresso na venação e margens foliares, em tricomas e epiderme de *B. distachyon*.

O interesse nos mecanismos de sinalização sistêmica em espécies cultivadas tem crescido por possuir grande potencial para aumentar a tolerância das culturas contra estresses bióticos e abióticos (Dietz, 2016b). No tratamento em LED Branca houve o aumento da atividade da SOD de 2,92 para 3,60 vezes e na CAT o aumento de 1,57 para 3,03 vezes, se comparado à LF. Os resultados sugerem que no estresse oxidativo durante o desenvolvimento de *B. distachyon* in vitro, SOD e CAT são importantes componentes do mecanismo de defesa antioxidativo induzido por LED Branca e que o aumento da atividade dessas enzimas evidencia a produção de radicais livres como:

radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Dietz, 2016 a).

No presente estudo observou-se que a qualidade espectral da LED Branca induz um mecanismo de defesa antioxidativa em *B. distachyon*, além de diminuir a expressão de genes da síntese de celulose. Plantas cultivadas em LED A/V aumentam os níveis de expressão de PAL1 e F5H1 que por sua vez aumenta o teor de lignina e reduz a expressão de CESA4 que reduz o teor de celulose. Esses resultados, em conjunto, contribuem para uma melhor compreensão do envolvimento de qualidades espectrais do vermelho e azul, na formação da parede celular, assim como na regulação da síntese e no acúmulo de lignina e celulose nessa importante planta-modelo, empregando-se o sistema de cultura *in vitro*.

Referências

Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2016) Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *J Photochem Photobiol B* 154: 51-56. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015.

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122(2): 299-308. doi:10.1007/s11240-015-0766-7

Arena C, Tsonev T, Doneva D, Micco V, Michelozzi M, Brunetti C, Centritto M, Fineschi S, Velikova V, Loreto F (2016) The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). *Environ Exp Bot* 130:122-132. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.05.014

Bagal UR, Leebens-Mack JH, Lorenz WW, Dean JF (2012) The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC Genomics* 13: 1-9. doi:10.1186/1471-2164-13-S3-S1.

Batista DS, Castro KM, Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 52(3): 276-282. doi:10.1007/s11627-016-9761-x

Batista DS, Dias LLC, Rêgo MM, Saldanha CW, Otoni WC (2017) Flask sealing on in vitro seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural* 47(3): 1-6. doi:10.1590/0103-8478cr20150245

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44(1): 276-287. doi:10.1016/0003-2697(71)90370-8

Bischoff V, Desprez T, Mouille G, Vernhettes S, Gonneau M, Hofte H (2011) Phytochrome regulation of cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 21(21): 1822-1827. doi:10.1016/j.cub.2011.09.026.

Bland DE (1966) Colorimetric and chemical identification of lignins in different parts of *Eucalyptus botryoides* and their relation to lignification. *Holzforschung* 20(1): 12-16. doi:10.1515/hfsg.1966.20.1.12

Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo AL, Gao C, Gu Y, Hazen SP, Holt III BF, Hong SH,

Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LAJ, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, Vogel JP (2011) Brachypodium as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol* 157(1): 3-13. doi:10.1104/pp.111.179531

Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R, Turnera SR (2005) Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17: 2281-2295. doi:10.1105/tpc.105.031542

Brown D, Wightman R, Zhang Z, Gomez LD, Atanassov I, Bukowski JP, Tryfona T, McQueen-Mason SJ, Dupree P, Turner S (2011) Arabidopsis genes IRREGULAR XYLEM (IRX15) and IRX15L encode DUF579-containing proteins that are essential for normal xylan deposition in the secondary cell wall. *Plant J* 66(3): 401-413. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04501.x.

Cass CL, Peraldi A, Dowd PF, Mottiar Y, Santoro N, SD, Bukhman YV, Foster CE, Thrower N, Bruno LC, Moskvina OV, Johnson ET, Willhoit ME, Phutane M, Ralph J, Mansfeld SD, Nicholson P, Sedbrook J C (2015) Effects of PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in Brachypodium. *J Exp Bot* 66(14): 4317–4335. doi:10.1093/jxb/erv269

Des Marais DL, Juenger TE (2015) Brachypodium and the Abiotic Environment. In: Vogel JP (ed): *Genetics and genomics of Brachypodium*, Springer, New York, pp. 291-311. doi:10.1007/7397_2015_13

Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34(7):1023–1028. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515

Dietz KJ (2016a) Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? *Mol Cells* 39(1): 20-25. doi:10.14348/molcells.2016.2324

Dietz KJ (2016b) Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiol* 171(3): 1535-1539. doi:10.1104/pp.16.00938

Dong C, Shao L, Liu G, Wang M, Liu H, Xie B, Li B, Fu Y, Liu H. (2015) Photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield of wheat exposed to intermittent light irradiation with millisecond-scale periods. *J Plant Physiol* 184:28-36. doi:10.1016/j.jplph.2015.06.012.

Fang W, Chen CC, Lee YI, Chang MY (2011) Development of LED lids for tissue culture lighting. *Acta Hort* 907: 397-402. doi:10.17660/ActaHortic.2011.907.67

Fang W, Jao RC (2000). A review on artificial lighting of tissue cultures and transplants. In: Kubota C and Chun C (eds.) *Transplant production in the 21st century*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 108-113.

Fankhauser C, Staiger D (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 216(1): 1–16.doi:10.1007/s00425-002-0831-4

Ferreira LT, Silva MMA, Ulisses C, Camara TR, Willadino L (2016) Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128: 211-221. doi:10.1007/s11240-016-1101-7

Foster CE, Martin TM, Pauly M (2010a) Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (Lignocellulosic biomass). Part I: Lignin. *JVisExp* 37.doi: 10.3791/1745

Foster CE, Martin TM, Pauly M (2010b) Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (Lignocellulosic biomass). Part II: Carbohydrates. *J VisExp*37.doi:10.3791/1837

Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA (2001) Down regulation of caffeic acid3-O-methyl transferase and caffeoyl CoA 3-O-methyl transferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignins structure and implications for the biosynthesis is of G and S lignin. *Plant Cell* 13(1): 73-88. doi:10.1105/tpc.13.1.73

Gupta SD, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 7: 211-220

Gupta SD, Sahoo TK (2015) Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during in vitro shoot organogenesis of *Curculigo orchoides* Gaertn. *Acta Physiol Plant* 37: 1-9. doi:10.1007/s11738-015-1990-9

Handakumbura PP, Matos DA, Osmont KS, Harrington MJ, Heo K, KafleK, Kim SH, Baskin T, Hazen SP (2013) Perturbation of *Brachypodium distachyon* CELLULOSE SYNTHASE A4 or 7 results in abnormal cell walls. *BMC Plant Biol* 13(131): 1-15. doi:10.1186/1471-2229-13-131

Hasterok R, Betekhtin A, Borowska-Zuchowska N, Braszewska-Zalewska A, Idziak-Helmcke D, Robaszkiewicz E, Wolny E. *Molecular Cytogenetics in the Genus Brachypodium*. In: Vogel JP (ed): *Genetics and Genomics of Brachypodium*, Springer, New York, pp. 39-54. doi: 10.1007/7397_2015_1

Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84(2):450-455. doi:10.1104/pp.84.2.450

Hernando-Amado S, González-Calle V, Carbonero P, Barrero-Sicilia C (2012) The family of DOF transcription factors in *Brachypodium distachyon*: phylogenetic comparison with rice and barley DOFs and expression profiling. *BMC Plant Biol* 12(202): 1-13. doi:10.1186/1471-2229-12-202

Huché-Théliér L, Crespel L, Le Gourrierc J, Morel P, Sakr S, Leduc N (2016) Light signaling and plant responses to blue and UV radiations - Perspectives for applications in horticulture. *Environ Exp Bot* 121: 22-38. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.06.009

Hung CD, Hong CH, Kim SK, Lee KH, Park JY, Nam MW, Choi DH, Lee, HI (2016) LED light for in vitro and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiol Plant* 38(6): 1-9. doi:10.1007/s11738-016-2164-0

Jung ES, Lee S, Lim SH, Ha SH, Liu KH, Lee CH (2013) Metabolite profiling of the short-term responses of rice leaves (*Oryza sativa* cv. Ilmi) cultivated under different LED lights and its correlations with antioxidant activities. *Plant Sci* 210: 61-69. doi:10.1016/j.plantsci.2013.05.004.

Kellogg EA (2015) Description of the family, vegetative morphology and anatomy. In: Kellogg EA (ed.) *The families and genera of vascular plants: Flowering Plants. Monocots, Poaceae*, Springer, New York, pp. 3-23.

Kim J-H, Yang DH, Kim J-S, Baek M-H, Park YM, Wi SG, Cho J-Y, Chung BY (2006) Cloning, characterization, and expression of two cDNA clones for a rice ferulate-5-hydroxylase gene, a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *J Plant Biol* 49(3): 200-204. doi:10.1007/BF03030533

Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol* 41:455-496.

Lin C (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14(sup 1):S207-S225. doi:10.1105/tpc.000646

Lin SY, Dance CW (1992) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin, 608 p.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

- Lu F, Marita JM, Lapierre C, Jouanin L, Morreel K, Boerjan W, Ralph J (2010) Sequencing around 5-hydroxyconiferyl alcohol-derived units in caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplar lignins. *Plant Physiol* 153(2): 569-579. doi:10.1104/pp.110.154278
- Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, Ko CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro. *Hortic Environ Biotechnol* 56(1): 105-113. doi:10.1007/s13580-015-0114-1
- Manivannan A, Soundararajan P, Park YG, We H, Kim S, Jeong BR (2017) Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of in vitro-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’. *Hortic Environ Biotechnol* 58(1): 12-20. doi:10.1007/s13580-017-0051-2
- Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Bell-Lelong DA, Chapple C (1998) Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *PNAS* 95(12): 6619-6623.
- Mur LA, Allainguillaume J, Catalán P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel J (2011) Exploiting the Brachypodium tool box in cereal and grass research. *New Phytol* 191(2):334-347. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03748.x
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nakano J, Meshitsuka G (1992) The detection of lignin. In: Lin S (ed). *Methods in Lignin Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, pp 23-32.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22(5):867-880. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Ouzounis T, Fretté X, Rosenqvist E, Ottosen CO (2014) Spectral effects of supplementary lighting on the secondary metabolites in roses, chrysanthemums, and campanulas. *J Plant Physiol* 171: 1491–1499. doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.012
- Pacheco FV, Avelar RP, Alvarenga ICA, Bertolucci SKV, Alvarenga AA, Pinto JEP (2016) Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. *Ind Crops Prod* 85: 251-257. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.016
- Petrik DL, Cass CL, Padmakshan D, Foster CE, Vogel JP, Karlen SD, Ralph J, Sedbrook JC (2016) BdCESA7, BdCESA8, and BdPMT utility promoter constructs for targeted expression to secondary cell-wall-forming cells of grasses. *Front Plant Sci* 7:55. doi: 10.3389/fpls.2016.00055

Poudel PR, Kataoka I, Mochioka R (2008) Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92: 147-153. doi:10.1007/s11240-007-9317-1

Ralph J, Guillaumie S, Grabber JH, Lapierre C, Barrière Y (2004) Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Towards a forage grass ideotype. *C R Biol* 327 (5): 467-479. doi:10.1016/j.crv.2004.03.004

Ralph J, Lapierre C, Marita JM, Kim H, Lu F, Hatfield RD, Ralph S, Chapple C, Franke R, Hemm MR, Van Doorselaere J, Sederoff RR, O'Malley DM, Scott JT, Mackay JJ, Yahiaoui N, Boudet A, Pean M, Pilate G, Jouanin L, Boerjan W (2001) Elucidation of new structures in lignins of CAD and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* 57(6):993-1003. doi:10.1016/S0031-9422(01)00109-1

Ruprecht C; Staffan Persson S. Co-expression of cell wall-related genes: new tools and insights. *Front Plant Sci* 3: 1-7. doi:10.3389/fpls.2012.00083

Saebo A, Krekling, T, Appelgren M (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 41(2): 177-185. doi:10.1007/BF00051588

Szopa A, Ekier TH (2016) The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 127(1): 115- 121. doi:10.1007/s11240-016-1034-1

Tohge T, Fernie AR (2010) Combining genetic diversity, informatics and metabolomics to facilitate annotation of plant gene function. *Nat Protoc* 5: 1210-1227

Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler, TC, Hazen SP (2013) Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid O-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnol* 13: 1-18. doi:10.1186/1472-6750-13-61

Vanholme R, Storme V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K, Boerjan W (2012) A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (9): 3506-3529. doi:10.1105/tpc.112.102574

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153(3): 895-905. doi:10.1104/pp.110.155119

Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2008) Lignin engineering. *Curr Opin Plant Biol* 11(3):278–285. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.005

Van Acker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels* 6:46. doi:10.1186/1754-6834-6-46

Vargas L, Cesarino I, Vanholme R, Voorend W, Saleme MLS, Morreel K, Boerjan W (2016) Improving total saccharification yield of *Arabidopsis* plants by vessel-specific complementation of caffeoylshikimate esterase (cse) mutants. *Biotechnol Biofuels* 9:139. doi:10.1186/s13068-016-0551-9

Vogel J (2008) Unique aspects of the grass cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 11(3): 301-307. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.002

Vogel JP (2015) The rise of *Brachypodium* as a model system. In: Vogel JP (ed): *Genetics and Genomics of Brachypodium*, New York, pp.1-7. doi:10.1007/7397_2015_14

Wang X.Y, Xu XM, Cui J (2015) The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light. *Photosynthetica* 53(2): 213-222. doi:10.1007/s11099-015-0083-8

Wardrop AB (1981). Lignification and xylogenesis. In: Barnett JR (ed) *Xylem Cell Development*, Castle House Publications, Tunbridge Wells, UK, pp. 115-152.

Weng JK, Mo H, Chapple C (2010) Over-expression of F5H in COMT-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin and disruption of pollen wall formation. *Plant J* 64(6): 898-911. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04391.x

Zhan L, Li Y, Hu J, Pang L, Fan. H (2012) Browning inhibition and quality preservation of fresh-cut romaine lettuce exposed to high intensity light. *Innov. Food sSci. & Emerg. Technol* 14: 70-76. doi:10.1016/j.ifset.2012.02.004

Zhang B, Deng L, Qian Q, Xiong G, Zeng D, Li R, Guo L, Li J, Zhou Y (2009) A missense mutation in the transmembrane domain of CESA4 affects protein abundance in the plasma membrane and results in abnormal cell wall biosynthesis in rice. *Plant Mol Biol* 71(4-5): 509-524. doi:10.1007/s11103-009-9536-4

Zienkiewicz M, Drożak A, Wasilewska W, Baćławska I, Przedpelska-Wąsowicz E, Romanowska E. (2015) The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. *Planta* 242(6): 1479-1493. doi:10.1007/s00425-015-2392-3.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais, à luz dos resultados obtidos, conclui-se que:

A perda da capacidade regenerativa de calos de *Brachypodium distachyon* ocorre após 90 dias, enquanto que calos mais velhos (120 a 240 dias) são menos indicados para produção de plantas. O perfil metabólico de calos e estruturas embriogênicas corrobora com características de desenvolvimento e calos de 60 e 90 dias são os maiores produtores de estruturas embriogênicas com maiores quantidades de metabólitos ativos. Além disso, observou-se que a idade dos calos não tem relação com o percentual de plantas poliploides.

Alguns metabólitos como ácido aspártico, asparagina, triptofano e glicina foram encontrados em menores quantidades em CNE, sugerindo serem indispensáveis para competência embriogênica em *B. distachyon*.

Os conhecimentos adquiridos sobre a longevidade de calos embriogênicos de *B. distachyon* refletem em ganhos no seu uso como matéria prima para os protocolos de transformação de plantas.

A qualidade da luz durante o cultivo de *B. distachyon* altera o teor de lignina e celulose.

A qualidade de luz provocou alterações na morfogênese, que foi acompanhada por alterações na anatomia, na expressão de genes lignocelulósicos e sistema antioxidante.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela 1. Valores relativos de metabólitos identificados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) de calos embriogênicos (CE) de *Brachypodium distachyon*.

Metabólitos	Dias									
	30	CNE	60	90	120	150	180	210	240	360
Aminoácidos										
Beta Alanina	1 ± 0.05	0.92 ± 0.03	4.26 ± 0.81	3.00 ± 0.22	3.56 ± 0.75	8.22 ± 1.41	4.46 ± 0.24	7.52 ± 0.26	6.34 ± 0.64	0.04 ± 0.00
Asparagina	1 ± 0.04	0.53 ± 0.06	3.10 ± 1.10	4.69 ± 1.81	16.17 ± 4.73	24.81 ± 6.61	6.44 ± 0.41	15.62 ± 2.14	30.33 ± 4.26	0.61 ± 0.07
Ácido aspártico	1 ± 0.05	0.31 ± 0.02	1.35 ± 0.26	1.07 ± 0.12	1.81 ± 0.15	3.18 ± 0.18	1.39 ± 0.09	2.33 ± 0.21	2.92 ± 0.11	0.02 ± 0.00
Cisteína	1 ± 0.20	1.16 ± 0.16	0.86 ± 0.03	1.51 ± 0.16	1.15 ± 0.16	1.22 ± 0.32	0.75 ± 0.06	2.01 ± 0.48	1.58 ± 0.16	0.54 ± 0.18
Glicina	1 ± 0.11	0.73 ± 0.09	2.21 ± 0.30	3.51 ± 0.39	4.10 ± 0.83	10.02 ± 1.06	3.69 ± 0.43	8.19 ± 0.50	4.56 ± 0.59	0.35 ± 0.02
Isoleucina	1 ± 0.05	0.99 ± 0.03	1.40 ± 0.09	2.43 ± 0.11	4.34 ± 0.57	7.05 ± 0.82	2.77 ± 0.20	8.92 ± 1.50	8.19 ± 0.94	0.29 ± 0.04
Leucina	1 ± 0.04	1.12 ± 0.04	2.38 ± 0.26	2.44 ± 0.13	2.88 ± 0.21	3.84 ± 0.35	2.41 ± 0.12	3.11 ± 0.11	3.10 ± 0.23	0.13 ± 0.01
Metionina	1 ± 0.08	1.72 ± 0.06	4.43 ± 1.02	2.35 ± 0.36	6.56 ± 0.88	7.99 ± 1.34	7.31 ± 0.72	10.26 ± 0.37	14.23 ± 1.01	0.06 ± 0.01
Serina	1 ± 0.01	0.91 ± 0.03	1.27 ± 0.02	0.79 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.59 ± 0.02	0.64 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.01 ± 0.00
Triptofano	1 ± 0.08	0.54 ± 0.04	1.74 ± 0.48	1.72 ± 0.36	2.43 ± 0.42	4.54 ± 0.82	2.52 ± 0.58	15.32 ± 2.21	8.65 ± 0.62	0.29 ± 0.01
Valina	1 ± 0.04	1.43 ± 0.07	1.59 ± 0.24	1.48 ± 0.08	2.07 ± 0.19	2.49 ± 0.29	1.34 ± 0.08	2.77 ± 0.33	2.24 ± 0.15	0.09 ± 0.01
Açúcares										
Glicose	1 ± 0.08	34.02 ± 13.41	24.15 ± 1.11	37.19 ± 0.46	21.63 ± 1.40	16.56 ± 1.31	10.68 ± 1.04	6.73 ± 0.06	14.63 ± 0.95	26.33 ± 9.04
Frutose	1 ± 0.01	1.70 ± 0.00	0.98 ± 0.02	1.21 ± 0.01	0.88 ± 0.07	0.62 ± 0.05	0.57 ± 0.01	0.36 ± 0.11	0.50 ± 0.04	0.94 ± 0.20
Celobiose	1 ± 0.04	2.48 ± 0.19	1.72 ± 0.26	2.68 ± 0.09	2.18 ± 0.36	2.60 ± 0.46	3.34 ± 0.19	1.91 ± 0.44	2.74 ± 0.34	0.52 ± 0.03
Eritrose	1 ± 0.08	1.05 ± 0.05	0.95 ± 0.09	0.58 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.52 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.32 ± 0.02	13.39 ± 2.30
Kestose	1 ± 0.07	1.93 ± 0.14	0.77 ± 0.09	1.27 ± 0.06	1.89 ± 0.19	1.45 ± 0.45	1.44 ± 0.18	0.54 ± 0.30	3.89 ± 0.29	1.14 ± 0.18
Maltotriose	1 ± 0.07	0.82 ± 0.15	4.54 ± 1.30	5.89 ± 0.41	7.09 ± 0.40	6.39 ± 0.81	12.37 ± 1.35	6.52 ± 0.52	21.85 ± 2.17	1.58 ± 0.26
Xilose	1 ± 0.04	1.15 ± 0.05	0.74 ± 0.04	2.72 ± 0.15	2.54 ± 0.13	1.54 ± 0.08	2.60 ± 0.18	1.29 ± 0.41	2.76 ± 0.30	1.46 ± 0.22

Trealose	1 ± 0.08	1.30 ± 0.07	1.34 ± 0.10	6.17 ± 0.25	3.92 ± 0.29	1.50 ± 0.23	7.88 ± 0.40	3.03 ± 1.01	3.05 ± 0.28	13.97 ± 0.83
Açúcares álcoois										
Glicerol	1 ± 0.01	0.94 ± 0.07	1.10 ± 0.03	1.19 ± 0.08	1.24 ± 0.13	0.65 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.70 ± 0.07	0.73 ± 0.04
Mio-Inositol	1 ± 0.00	1.03 ± 0.01	1.08 ± 0.08	0.83 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.75 ± 0.05	0.44 ± 0.00	0.28 ± 0.07	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01
Mio-Inositol-P	1 ± 0.05	0.74 ± 0.03	3.16 ± 0.60	5.59 ± 0.34	3.03 ± 0.17	2.97 ± 0.24	10.49 ± 1.07	7.18 ± 0.34	4.23 ± 0.79	0.38 ± 0.07
Xilitol	1 ± 0.03	1.03 ± 0.02	0.93 ± 0.03	0.82 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.86 ± 0.02	0.65 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.80 ± 0.03	0.94 ± 0.01
Celobitol	1 ± 0.06	1.05 ± 0.05	3.49 ± 0.39	5.22 ± 0.32	4.09 ± 0.42	5.71 ± 0.81	8.62 ± 0.56	4.85 ± 0.49	12.12 ± 0.70	2.72 ± 0.19
Ácidos orgânicos										
Ácido benzóico	1 ± 0.05	1.07 ± 0.09	1.16 ± 0.07	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.49 ± 0.01
Ácido butanóico	1 ± 0.04	1.05 ± 0.07	5.48 ± 1.33	9.12 ± 1.04	6.88 ± 1.44	18.15 ± 1.99	8.60 ± 0.60	9.33 ± 0.17	7.91 ± 1.02	0.03 ± 0.00
Ácido fumárico	1 ± 0.06	1.17 ± 0.15	0.97 ± 0.08	0.48 ± 0.05	0.54 ± 0.02	0.71 ± 0.07	0.54 ± 0.07	0.60 ± 0.10	1.03 ± 0.06	0.99 ± 0.25
Ácido glucurônico	1 ± 0.09	1.75 ± 0.17	1.83 ± 0.20	3.17 ± 0.06	2.34 ± 0.24	3.08 ± 0.24	3.44 ± 0.29	3.34 ± 0.09	2.90 ± 0.13	1.02 ± 0.16
Ácido glutárico	1 ± 0.04	0.83 ± 0.06	1.44 ± 0.14	1.12 ± 0.05	1.06 ± 0.11	1.70 ± 0.30	0.92 ± 0.10	2.75 ± 0.54	1.73 ± 0.07	0.26 ± 0.06
Ácido propanóico	1 ± 0.11	0.97 ± 0.05	1.05 ± 0.12	0.59 ± 0.04	0.51 ± 0.08	0.46 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.55 ± 0.06
Ácido málico	1 ± 0.38	1.19 ± 0.22	2.36 ± 0.23	10.36 ± 2.12	4.70 ± 0.76	4.06 ± 0.52	3.50 ± 0.41	3.94 ± 0.20	3.34 ± 0.39	1.03 ± 0.19
Ácido malônico	1 ± 0.19	0.95 ± 0.22	3.49 ± 0.62	1.61 ± 0.25	2.56 ± 1.56	26.97 ± 6.92	4.17 ± 0.48	27.98 ± 1.26	5.61 ± 2.67	0.43 ± 0.05
Ácido succínico	1 ± 0.05	0.72 ± 0.03	1.08 ± 0.18	0.46 ± 0.05	0.78 ± 0.08	0.80 ± 0.08	0.66 ± 0.08	0.96 ± 0.08	1.25 ± 0.06	0.06 ± 0.01
Outros										
Ácido cafeoilquínico	1 ± 0.03	0.88 ± 0.06	1.60 ± 0.13	2.33 ± 0.15	4.89 ± 0.49	8.82 ± 1.53	4.46 ± 0.55	8.87 ± 0.85	29.81 ± 1.95	0.86 ± 0.08
Ácido cinâmico	1 ± 0.02	0.95 ± 0.03	0.95 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.47 ± 0.06
Ácido ferúlico	1 ± 0.02	1.33 ± 0.13	1.39 ± 0.15	1.65 ± 0.07	1.31 ± 0.18	1.13 ± 0.06	1.48 ± 0.21	0.62 ± 0.02	2.38 ± 0.34	1.48 ± 0.20
Putrescina	1 ± 0.10	1.20 ± 0.05	1.56 ± 0.13	0.94 ± 0.04	1.00 ± 0.06	1.07 ± 0.06	0.64 ± 0.00	0.46 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.41 ± 0.04
Uracil	1 ± 0.04	1.17 ± 0.08	1.33 ± 0.10	1.09 ± 0.04	1.15 ± 0.04	1.61 ± 0.07	1.52 ± 0.09	2.00 ± 0.16	2.81 ± 0.30	3.69 ± 0.25

Os valores obtidos foram normalizados em relação à média de calos de 30 dias e apresentados com o erro padrão relativo (n = 5). Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade (p<0,05) pelo teste t. Calos não-embriogênicos (CNE).

Tabela 2. Valores relativos de metabólitos identificados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) de estruturas embriogênicas (EE) de *Brachypodium distachyon*.

Metabólitos	Dias						
	60	90	120	150	180	210	240
Aminoácidos							
Beta Alanina	1 ± 0.11	0.52 ± 0.20	0.16 ± 0.05	0.16 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.57 ± 0.08	0.71 ± 0.15
Arginina	1 ± 0.19	1.41 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Asparagina	1 ± 0.66	11.53 ± 2.51	4.83 ± 2.36	13.77 ± 3.50	8.87 ± 1.82	1.82 ± 0.31	2.49 ± 0.81
Ácido aspártico	1 ± 0.14	1.46 ± 0.10	0.18 ± 0.08	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.06	0.47 ± 0.04	0.67 ± 0.07
Glicina	1 ± 0.13	1.12 ± 0.24	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Histidina	1 ± 0.08	2.03 ± 0.40	1.33 ± 0.13	1.34 ± 0.07	0.85 ± 0.12	1.00 ± 0.18	2.02 ± 0.28
Homoserina	1 ± 0.16	0.55 ± 0.11	0.25 ± 0.02	0.31 ± 0.06	0.21 ± 0.01	0.45 ± 0.13	0.72 ± 0.12
Leucina	1 ± 0.15	0.90 ± 0.21	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Metionina	1 ± 0.33	1.80 ± 0.06	0.40 ± 0.05	0.41 ± 0.06	0.38 ± 0.07	0.39 ± 0.08	0.75 ± 0.07
Ornitina	1 ± 0.23	2.26 ± 0.42	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.07 ± 0.01
Triptofano	1 ± 0.11	1.15 ± 0.30	0.19 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.29 ± 0.06
Valina	1 ± 0.17	1.55 ± 0.13	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Açúcares							
Glicose	1 ± 0.06	0.90 ± 0.06	0.71 ± 0.09	0.74 ± 0.22	0.40 ± 0.09	0.85 ± 0.09	1.02 ± 0.05
Frutose 1-P	1 ± 0.28	0.41 ± 0.10	0.27 ± 0.08	0.31 ± 0.14	0.15 ± 0.04	0.66 ± 0.10	1.19 ± 0.32
Celobiose	1 ± 0.18	0.45 ± 0.12	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.09	0.10 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.50 ± 0.08
Eritrose	1 ± 0.08	1.02 ± 0.04	1.49 ± 0.03	1.49 ± 0.08	0.74 ± 0.06	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.03
Galactosamina	1 ± 0.21	0.44 ± 0.10	0.24 ± 0.14	0.30 ± 0.25	0.02 ± 0.01	0.59 ± 0.14	0.86 ± 0.22
Galactose	1 ± 0.14	0.77 ± 0.22	6.48 ± 0.25	4.93 ± 0.48	2.21 ± 0.31	3.09 ± 0.20	3.68 ± 0.10
Isomaltose	1 ± 0.24	0.27 ± 0.06	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.50 ± 0.08
Kestose	1 ± 0.24	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.50 ± 0.16	0.38 ± 0.15	0.47 ± 0.13	1.87 ± 0.62
Maltotriose	1 ± 0.10	0.84 ± 0.16	0.59 ± 0.12	0.64 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.94 ± 0.22	2.33 ± 0.16

Melibiose	1 ± 0.02	1.03 ± 0.03	1.57 ± 0.15	1.94 ± 0.14	0.93 ± 0.13	0.91 ± 0.08	0.93 ± 0.13
Tagatose	1 ± 0.09	1.79 ± 0.34	0.53 ± 0.00	0.62 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.02
Trealose	1 ± 0.22	0.24 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.33 ± 0.07
Açúcares álcoois							
Mio-Inositol 1-P	1 ± 0.05	2.04 ± 0.24	0.99 ± 0.05	0.70 ± 0.06	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.03	0.58 ± 0.05
Galactinol	1 ± 0.27	0.42 ± 0.14	0.12 ± 0.06	0.15 ± 0.09	0.11 ± 0.03	0.33 ± 0.05	0.26 ± 0.04
Eritritol	1 ± 0.14	0.72 ± 0.08	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.11	0.23 ± 0.03	0.88 ± 0.18	1.21 ± 0.30
Gliceraldeído	1 ± 0.07	1.00 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.01
Ácidos orgânicos							
Ácido acético	1 ± 0.06	1.02 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.12 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Ácido fumárico	1 ± 0.15	1.37 ± 0.02	1.08 ± 0.26	1.04 ± 0.14	0.39 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.33 ± 0.02
Ácido galacturônico 1-P	1 ± 0.23	0.24 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.27 ± 0.07
Ácido glucurônico	1 ± 0.17	2.91 ± 0.34	0.37 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.38 ± 0.09	0.54 ± 0.16	1.12 ± 0.11
Ácido glucônico 6-P	1 ± 0.09	0.75 ± 0.01	0.83 ± 0.12	0.88 ± 0.06	0.48 ± 0.08	0.66 ± 0.05	0.92 ± 0.16
Ácido glutárico	1 ± 0.17	0.69 ± 0.12	0.37 ± 0.09	0.44 ± 0.13	0.19 ± 0.02	1.09 ± 0.62	2.39 ± 1.10
Ácido malônico	1 ± 0.35	0.31 ± 0.04	0.21 ± 0.01	0.30 ± 0.10	0.11 ± 0.01	0.63 ± 0.07	0.58 ± 0.14
Oxaloacetato	1 ± 0.14	1.91 ± 0.43	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Outros							
Ácido cinâmico	1 ± 0.11	1.25 ± 0.04	0.78 ± 0.06	0.58 ± 0.05	0.30 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.21 ± 0.03
Ácido ferúlico	1 ± 0.13	1.62 ± 0.09	1.30 ± 0.05	1.39 ± 0.09	0.77 ± 0.07	0.43 ± 0.06	0.32 ± 0.02
Flavona	1 ± 0.21	0.50 ± 0.06	0.51 ± 0.05	1.15 ± 0.27	0.54 ± 0.10	1.58 ± 0.38	2.00 ± 0.78
Ácido fenilacético	1 ± 0.07	0.97 ± 0.16	1.21 ± 0.02	1.26 ± 0.12	0.57 ± 0.08	0.71 ± 0.11	0.69 ± 0.10
Uracil	1 ± 0.15	1.68 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.78 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.39 ± 0.08	0.26 ± 0.02

Os valores obtidos foram normalizados em relação à média de calos de 60 dias e apresentados com o erro padrão relativo (n = 5). Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade (p<0,05) pelo teste t.

Primers de genes da rota da lignina e parede celular

>Bradi3g49250.2 (PAL1)

Primer fw: TCGAGCTCCTCAGGCATCTGA

Primer rv: TGCCGGAGTAGCCCTGGAGAA

>Bradi3g54950.1(CCR)

Primer fw: ACCGCCAAGTGCCAAGTCGAC

Primer rv: TGACCGTATTGCTGCAGGGACAT

>Bradi3g06480.1 (CAD1)

Primer fw: ACACCTACACCCCTCAGGAAGAC

Primer rv: GCCGCAGTACAGAACTTTTACC

>Bradi3g05750.1 (4CL3)

Primer fw: AGGAGGCCGCTGTTGTATCATTG

Primer rv: ACGAACGCGACAGGGATTTTAC

>Bradi2g31510.1 (C4H)

Primer fw: GGAGAAGACTGGTGAGATCAGGTG

Primer rv: GATGGCTGCGACGTTGATGTTC

>Bradi2g21300.1 (C3H)

Primer fw: ACAGTATGACCTTAGCGACGACAC

Primer rv: TCCAGCAGTGATCATGTCCCATAG

>Bradi3g48530.1 (HCT)

Primer fw: CACGTATAGAGGAGAGACCTTCGC

Primer rv: CCGCACCGTGATCTTCATCTTG

>Bradi3g30590.1 (F5H)

Primer fw: ATGGACGTGATGTTTCGGCGG

Primer rv: ACGGGCTGTGCATCATCTCC

>Bradi3g28350.1 (celulose sintase, BdCESa4)

Primer fw: TTTCGCATACACCAACACCATCG

Primer rv: CTCGCTAGGTTGTTCAAGTGTGG

>Bradi4g30540.1 (celulose sintase, BdCESa7)

Primer fw: GGCAACCTCAAGTGGCTCGAG)

Primer rv: AGGCTGGCAAATGTGCTAATCGG

>Bradi3g36887 (CCR1)

Primer fw: CGCATCCTCTCCAAGCTCT

Primer rv: CGGAGCTTCTGGTTCGACATCT

Normalizadores

>BdGAPDH (qRT-PCR)

139 pb

BdGAPDH_F: GCTCCCATGTTTGTGTGTCG

BdGAPDH_RV: GACCCTCAACAATGCCAAAG