

ELIZA LOUBACK COELHO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA ROTA BIOSSINTÉTICA DA LIGNINA
E IMUNOHISTOQUÍMICA DA PAREDE CELULAR EM *Pfaffia
glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN (AMARANTHACEAE)
CULTIVADA *IN VITRO* SOB ATMOSFERA ENRIQUECIDA DE
CO₂**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

S237e
2018 Santos, Eliza Louback Coelho dos, 1987-
Expressão gênica da rota biossintética da lignina e
imunohistoquímica da parede celular em *Pfaffia glomerata*
(Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) cultivada *in vitro* sob
atmosfera enriquecida de CO₂ / Eliza Louback Coelho dos
Santos. – Viçosa, MG, 2018.

ix, 34 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-34.

1. *Pfaffia glomerata* - Propagação *in vitro*. 2. Anticorpos
monoclonais. 3. Microscopia confocal. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

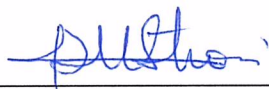
CDD 22. ed. 583.53

ELIZA LOUBACK COELHO DOS SANTOS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA ROTA BIOSINTÉTICA DA LIGNINA
E IMUNOHISTOQUÍMICA DA PAREDE CELULAR EM *Pfaffia
glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN (AMARANTHACEAE)
CULTIVADA *IN VITRO* SOB ATMOSFERA ENRIQUECIDA DE
CO₂**

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

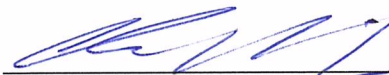
APROVADA: 06 de dezembro de 2018.



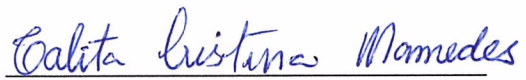
Renata Maria Strozi Alves Meira
(Coorientadora)



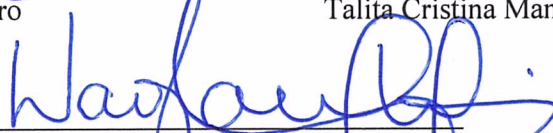
Ana Cláudia Ferreira da Cruz



Cleberson Ribeiro



Talita Cristina Mamedes



Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Ao meu amado marido Tiago e aos nossos filhos
Pedro e Maria Clara, vocês são meu maior tesouro.

Amo vocês.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai amado, pelo Seu amor insondável, pela força e pelo sustento diário até aqui. Obrigada por me proporcionar surpresas tão maravilhosas ao longo desse percurso.

À Universidade Federal de Viçosa e principalmente ao Programa de Pós Graduação em Botânica pela oportunidade de cursar esses 4 anos de doutorado e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu querido orientador Wagner Campos Otoni que me acolheu de forma tão querida, que não mediu esforços em me orientar, mesmo à distância e com um prazo tão apertado. Obrigada por ser esse profissional tão humano, o senhor é um grande exemplo a ser seguido.

A Professora Renata Maria Strozi Alves Meira pela coorientação e por sempre se mostrar tão solícita.

Ao Diego de Souza Batista, que foi muito mais que um coorientador, um grande colega que me ajudou em todos os momentos da execução deste trabalho, principalmente quanto às análises de expressão gênica. Sua dedicação e disponibilidade em ajudar são admiráveis, muito obrigada!

Aos professores do departamento de Biologia Vegetal, pelas disciplinas oferecidas, que contribuíram de forma valiosa para o meu aprendizado.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, nas pessoas de Gilmar, Karla, Carlota, Cris, Rosângela e Michele, pelos ensinamentos, pela agradável convivência, pelo auxílio no aprimoramento técnico e utilização dos equipamentos.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos II, principalmente aos colegas Evandro, Priscila, Lorena, Kamila, Amanda, Raysa, Wellington, Daniele, Ludmila, Márcia e Gabriela. Obrigada pela acolhida, pelos ensinamentos e principalmente pelos grandes momentos de descontração, sem os quais não deixaria essa jornada tão prazerosa!

Agradeço aos meus queridos amigos do grupo da fáfia Tatiane, Kristhiano e Sérgio, sem vocês esse trabalho não teria sido viável! Em especial à minha querida Tati, que me ensinou tanto, me auxiliou nas coletas e em algumas análises. Você é uma amiga maravilhosa, você vai longe pequena!

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, nas pessoas de Aurora e Rosana, queridas técnicas, sempre dispostas a ajudar. À querida Luana (Prima), grande companheira de caminhada, obrigada pelos momentos de descontração!

Aos amigos de fora das quatro pilastras Jordânia e Alan, só Deus sabe o quanto vocês foram importantes para mim. Jô querida, seu cuidado com o Pedro me encanta, você me instigou a ser uma mãe melhor! Muito obrigada pelos momentos alegres e tristes, pelas horas de conversa e por me ajudar no momento em que eu mais precisei, vocês são maravilhosos!

Aos grandes amigos da IPV, minha família em Cristo. Deus foi extremamente bondoso em colocar vocês na minha vida. Obrigada pela convivência, pelo apoio, pelas orações e principalmente por serem a minha família de Viçosa.

Às minhas queridas amigas que estão longe Lays e Larissa. Obrigada pela amizade incondicional, mesmo a distância. Vocês sempre se importaram comigo, cada uma à sua maneira. Obrigada por ouvirem meus desabafos, amo vocês e morro de saudades.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram tanto. Cada dia me espelho mais em vocês, meus grandes exemplos de sabedoria e amor. Obrigada por terem dedicado tanto do tempo de vocês, principalmente a minha mãe Márcia, por ter ficado tantos meses aqui comigo, para me ajudar com os meninos, para que eu pudesse finalizar esse Doutorado. Amo vocês.

À minha sogra Lucília que sempre se importou tanto conosco, sempre se dedicou em orar e ajudar conforme a necessidade, mesmo com tantas limitações. A senhora é um grande exemplo para mim.

Ao meu marido, meu melhor amigo, Tiago que esteve ao meu lado em todos os momentos. Agradeço a Deus por ter colocado um homem tão maravilhoso na minha vida e que proporcionou minha maior alegria, nossos filhos. Você é um exemplo de pai dedicado, obrigada por ter deixado tantos sonhos de lado para cuidar dos nossos filhos para que eu pudesse finalizar o doutorado. Esse trabalho não teria saído sem você. Obrigada por ter me auxiliado desde a execução à escrita dessa Tese, essa vitória é nossa! Te amo cada dia mais.

Aos meus amados filhos Pedro e Maria Clara, é uma honra ser mãe de vocês, meus verdadeiros presentes de Deus. Vocês, mais que todas as pessoas, criaram em mim a força que eu precisava para terminar essa Tese. Obrigada por serem essas bênçãos na minha vida. Mamãe ama muito vocês.

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução	1
Material e Métodos	6
Material Vegetal.....	6
Análise Experimental.....	6
Análises de Crescimento.....	7
Atividade fotossintética <i>in vitro</i>	7
Imunohistoquímica.....	7
Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR.....	8
Análises Estatísticas.....	9
Resultados	10
Discussão	13
Tabelas	20
Figuras	22
Referências Bibliográficas	27

RESUMO

SANTOS, Eliza Louback Coelho dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2018. **Expressão gênica da rota biossintética da lignina e imuno-histoquímica da parede celular em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) cultivada *in vitro* sob atmosfera enriquecida de CO₂.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Renata Maria Strozi Alves Meira e Diego Silva Batista.

Dentre as espécies de interesse fitoterápicos destaca-se *Pfaffia glomerata*, conhecida popularmente como fáfia ou ginseng brasileiro. A propagação *in vitro* é uma importante alternativa no cultivo de plantas com propriedades farmacológicas e nutricionais de interesse industrial. No cultivo *in vitro*, a concentração de CO₂ no interior dos frascos contendo meio de cultura é reduzida, o que limita a fotossíntese. No sistema fotoautotrófico *in vitro*, as plantas são propagadas em meios de cultura onde a fonte de carbono é, exclusivamente, do CO₂ das trocas gasosas. Ao submeter a planta a um maior regime de concentração de CO₂, há o aumento das trocas gasosas, aumentando a qualidade da planta e sua sobrevivência, pois gera plantas mais vigorosas e com maior acúmulo de biomassa. A parede celular vegetal constitui grande porção da biomassa vegetal, sendo uma complexa mistura de macromoléculas, podendo ser celulose, pectinas, xiloglucanos, heteroxilanos, heteromananos, lignina, entre outros. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo analisar a dinâmica estrutural da deposição de parede celular assim como a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina em plantas de *Pfaffia glomerata* durante o cultivo *in vitro* em atmosfera enriquecida com CO₂. Para isso, vitroplantas de *P. glomerata* foram propagadas vegetativamente em meio MS sem adição de sacarose. As plantas foram colocadas em câmaras de acrílico com ar forçado contínuo a 400 e 1000 µL L⁻¹ de CO₂, e frascos controle foram posicionados do lado de fora das câmaras, sem ventilação forçada. O experimento foi avaliado aos 20, 30 e 40 dias de cultivo, totalizando nove tratamentos com 4 repetições. Foram realizadas análises de crescimento, fotossíntese e imunohistoquímica (utilizando anticorpos monoclonais JIM7, JIM13, LM5, LM10 e LM11) e, aos 40 dias, avaliação da expressão dos genes relacionados à rota biossintética da lignina (*PgC4H*, *PgCCoAOMT*, *PgCCR*, *PgCAD* e *PgCOMT*). O enriquecimento de CO₂ na concentração de 1000 µL L⁻¹ induziu maior crescimento e o maior acúmulo de massa vegetal, além de aumentar a taxa fotossintética. Os tratamentos com ventilação forçada, levaram a diminuição da expressão dos genes *PgC4H*, *PgCAD* e *PgCCR* em relação ao controle, sendo que o tratamento com ventilação forçada de 400 µL L⁻¹ teve os menores níveis de expressão. Os genes *PgCCoAOMT* e *PgCOMT* não apresentaram expressão significativa em relação ao controle. As análises

de imunohistoquímica mostraram que a deposição das pectinas detectadas pelo anticorpo JIM7 diminuiu ao longo do experimento. Quanto às pectinas detectadas pelo anticorpo LM5, apenas o tratamento de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 apresentou marcação intensa na região do xilema. A deposição de hemiceluloses e glicoproteínas, utilizando respectivamente os anticorpos LM10 e LM11 e o anticorpo JIM13, foi detectada exclusivamente nas regiões de parede secundária, diferindo apenas na intensidade, sendo o tratamento de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 o mais expressivo. O desenvolvimento *in vitro* de *P. glomerata*, em meio fotoautotrófico com atmosfera enriquecida com CO_2 , foi efetivo no aumento das taxas fotossintéticas, crescimento e acúmulo de biomassa. Além disso, o cultivo foi responsável por promover a diminuição da expressão dos genes da via de síntese da lignina e promover o incremento dos polissacarídeos da parede celular.

ABSTRACT

SANTOS, Eliza Louback Coelho dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2018. **Gene expression of the lignin biosynthetic route and immunohistochemistry of the cell wall in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) cultivated *in vitro* under CO₂ enriched atmosphere.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Renata Maria Strozi Alves Meira and Diego Silva Batista.

Pfaffia glomerata, popularly known as Brazilian ginseng, stands out as an important species of phytotherapeutic interest. *In vitro* propagation is an important alternative to the cultivation of plants with pharmacological and nutritional properties of industrial interest. In *in vitro* culture, the CO₂ concentration inside the flasks containing culture medium is reduced, which limits the photosynthesis. In the photoautotrophic *in vitro* system, plants are propagated in culture media where the CO₂ from gas exchanges is the exclusive source of carbon. By subjecting the plant to a higher CO₂ concentration regime, there is an increase in gas exchange, thus increasing the quality of the plant and its survival, as it generates more vigorous plants and with greater accumulation of biomass. The plant cell wall constitutes a large portion of the plant biomass, being a complex mixture of macromolecules, which can be cellulose, pectins, xyloglucans, heteroxylans, heteromannans and lignin, among others. Thus, the present study aims to analyze the structural dynamics of cell wall deposition as well as the expression of genes involved in lignin biosynthesis in *Pfaffia glomerata* plants during *in vitro* culture in CO₂ enriched atmosphere. Vitroplants of *P. glomerata* were propagated vegetatively in MS medium without addition of sucrose. The plants were placed in acrylic chambers with continuous forced air at 400 and 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ CO₂, and control vials were positioned outside the chambers without forced ventilation. The experiment was evaluated at 20, 30 and 40 days of cultivation, totaling nine treatments with 4 replicates. Analyses of growth, photosynthesis and immunohistochemistry (using monoclonal antibodies JIM7, JIM13, LM5, LM10 and LM11) were performed and, at 40 days, an evaluation of genes related to lignin biosynthetic route (*PgC4H*, *PgCCoAOMT*, *PgCCR*, *PgCAD* and *PgCOMT*) was performed. The enrichment of CO₂ at the concentration of 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ induced higher growth and greater accumulation of vegetal mass, besides an increase in the photosynthetic rate. The treatments with forced ventilation led to a decrease in the expression of *PgC4H*, *PgCAD* and *PgCCR* genes in relation to the control, and the forced ventilation treatment of 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ had the lowest levels of expression. The *PgCCoAOMT* and *PgCOMT* genes did not show significant expression in relation to the control.

Immunohistochemical analyzes showed that the deposition of pectin detected by the JIM7 antibody decreased throughout the experiment. The pectins detected by the LM5 antibody showed intense marking in the xylem region only in the treatment of 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ of CO_2 . The deposition of hemicelluloses and glycoproteins, using respectively the LM10, LM11 and the JIM13 antibody, was detected exclusively in the secondary wall regions, differing only in intensity, with the treatment of 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ of CO_2 being the most expressive. *In vitro* development of *P. glomerata*, in photoautotrophic medium with CO_2 enriched atmosphere, was effective in the increase of the photosynthetic rates, growth and accumulation of biomass. In addition, the cultivation was responsible to promoting the reduction of the expression of genes of the lignin synthesis pathway and promoting the increase in polysaccharides of the cell wall.

INTRODUÇÃO

Desde os primeiros registros históricos, observa-se a utilização de plantas para fins terapêuticos, sendo que este conhecimento simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (Maciel *et al.* 2002; Almeida *et al.* 2017).

Dentre as espécies de interesses fitoterápicos pode-se destacar a espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae), conhecida popularmente como fáfia, “ginseng do pantanal” ou “ginseng brasileiro” (Festucci-Buselli *et al.* 2008a; Santos *et al.* 2012)., é nativa da América do Sul e de ocorrência em vegetações dos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás (Alves *et al.* 2006; Corrêa Júnior 2008).

Várias propriedades medicinais vêm sendo atribuídas às espécies do gênero *Pfaffia* sp., tais como: tônico muscular, anabolizante, analgésica, antiinflamatória, antimutagênica, afrodisíaca, antidiabetes e possui ações antioxidantes (Festucci-Buselli *et al.* 2008a, b; Almeida *et al.* 2017). Tais propriedades são atribuídas ao metabólito 20-hidroxiecdisona, destacando assim o interesse da indústria farmacêutica na espécie *P. glomerata* (Festucci-Buselli *et al.* 2008a).

A propagação *in vitro* é uma técnica que constitui importante alternativa à ampliação do cultivo de plantas com propriedades farmacológicas e nutricionais de interesse industrial que pode reduzir a prática extrativista, permitindo assim, a conservação do pool gênico das populações naturais (Hussain *et al.* 2012) e obtenção de plantas com maior qualidade e produtividade de compostos químicos de interesse (Batista *et al.* 2017). Os benefícios desta técnica são atribuídos à maior possibilidade de controle dos fatores ambientais onde as plantas são cultivadas, tais como concentrações específicas de sais, carboidratos, reguladores de crescimento, umidade relativa, irradiância, trocas gasosas e ambiente asséptico (Gaspar *et al.* 1996). Entretanto, plantas micropropagadas se comparadas às cultivadas *in vivo*, mostram características peculiares, tais como ápices mal desenvolvidos, menor produção de cutícula e cera epicuticular, tecidos com baixa resistência mecânica, maior teor de água, estômatos não funcionais, folhas delgadas e pequenas com menos tricomas e baixa atividade fotoautotrófica (Kozai e Kubota 2005; Kozai 2010; Cha-um *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2011).

No cultivo *in vitro*, a concentração de CO₂ no interior dos frascos contendo meio de cultura é reduzida, o que limita a fotossíntese. Nos métodos tradicionais de propagação *in vitro* a fonte de carbono externa fornecida é a sacarose, e assim se mantém o

crescimento e desenvolvimento das plantas (Kozai 2010; Xiao *et al.* 2011). Por outro lado, no sistema fotoautotrófico *in vitro*, as plantas podem ser propagadas em meios de cultura que não contêm sacarose e a fonte de carbono é exclusivamente advinda das trocas gasosas entre os frascos de cultura e o ambiente externo. Uma das vantagens da remoção dos carboidratos no meio de cultura é a prevenção do crescimento rápido de microrganismos e redução de custos (Kozai 2010; Xiao *et al.* 2011; Pérez-Jiménez *et al.* 2015). Ao submeter a planta a um maior regime de concentração de CO₂, há aumento das trocas gasosas e melhoria da transição do meio *in vitro* para *ex vitro*, melhorando a qualidade da planta e sua sobrevivência (Corrêa *et al.* 2015; Batista *et al.* 2017).

Estudos anteriores realizados na nossa equipe de pesquisa focaram no estabelecimento e na otimização de condições de crescimento *in vitro* para *P. glomerata* e demonstraram que esta espécie tem um potencial notável para micropropagação em sistemas fotoautotróficos (Iarema *et al.* 2012; Saldanha *et al.* 2012, 2013, 2014; Corrêa *et al.* 2015, 2016; Batista *et al.* 2018). Nestes trabalhos, indivíduos de *P. glomerata* cultivados *in vitro* em recipientes contendo membranas permeáveis às trocas gasosas foram submetidos à atmosfera enriquecida com CO₂, através de um sistema de ventilação natural ou forçada. Este sistema permitiu o aumento das concentrações de carbono no interior dos frascos e viabilizaram a micropropagação fotoautotrófica sob atmosfera enriquecida com CO₂. Assim ficou evidente que a produção e propagação de *P. glomerata* era promissora ao serem submetidos a essas condições, pois os indivíduos se tornaram mais vigorosos e com maior acúmulo de biomassa.

A parede celular vegetal, além da importância funcional, constitui grande porção da biomassa vegetal, sendo uma complexa mistura de macromoléculas que são construídos a partir de uma gama de polissacarídeos/glicoconjugados estruturalmente variados que potencialmente incluem celulose, pectinas, xiloglucanos, heteroxilanos, heteromananos, glucanos de ligação mista e proteínas arabinogalactanos (AGPs ou glicoproteínas) fundamentais para definir e elaborar formas e funções da planta (Didi *et al.* 2015; Cornuault *et al.* 2015).

A bioquímica dos componentes da parede celular tem sido estudada extensivamente e, em termos gerais, a maioria das estruturas abundantes e difundidas está bem caracterizada (Burton *et al.* 2010; Cosgrove 2018). Uma série de modelos que descrevem a organização dos polímeros da parede celular foi apresentada e muitos deles representam as microfibrilas de celulose interligadas por hemiceluloses e incorporados em uma matriz péctica (Keegstra *et al.* 1973; McCann e Roberts 1994; Carpita e Gibeaut

1993; Somerville et al. 2004; Baba 2006). Trabalhos mais recentes, porém, permitiram uma visão mais detalhada, incluindo novos glicanos que podem compor a matriz da parede celular, como xiloglucanos, heteroxilanos e supramoléculas pécticas que também podem interagir com as microfibrilas de celulose e entre si (Zykwinska et al. 2007; Burton et al. 2010; Cosgrove 2014; Cosgrove 2018).

A celulose é o polissacarídeo vegetal mais abundante, responsável por 15 a 30% da massa seca de todas as paredes celulares primárias e uma grande porcentagem das paredes secundárias. Celulose é organizada na forma de microfibrilas, que são os conjuntos de cadeias (1→4)-β-D-glicano, ligadas umas às outras ao longo do seu comprimento (Carpita et al. 2015).

As pectinas associam-se entre si através da construção de pontes de Ca⁺² para formar uma rede coextensiva com a rede de celulose-hemicelulose (Carpita e Gibeaut 1993). Quanto maior o número de interações da cadeia péctica com as microfibrilas de celulose, a parede celular se torna mais elástica e robusta (Dyson *et al.* 2012). Polímeros pécticos são classificados em três grandes domínios: homogalacturonanos, que têm uma variação de metilesterificação, responsável pela regulação iônica, hidratação e estados de gel da matriz da parede celular; ramnogalacturonanos II, que ocorrem em todas as paredes celulares primárias na forma de cadeias laterais complexas do esqueleto de homogalacturonanos; e os ramnogalacturonanos I formados pela alternações de homogalacturonanos e as ramnose (Ridley *et al.* 2001).

As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos, que podem realizar ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose: elas não só podem revestir as microfibrilas de celulose, como também são longas o suficiente para cobrir a distância entre as microfibrilas e ligá-las para formar uma rede (Scheller e Ulvskov 2010; Carpita et al. 2015).

Por sua vez, a lignina é um dos principais compostos estruturais da parede celular secundária das plantas vasculares. É um componente frequente em tecidos como o xilema e o esclerênquima e está associada ao crescimento e desenvolvimento das plantas, conferindo resistência física ao corpo vegetal (Ma 2009; Hu *et al.* 2017). Há um forte consenso na literatura de que o aumento do teor de lignina pode ser usado como um dos principais indicadores para avaliar a resistência à acomodação das culturas (Chen *et al.* 2011; Peng *et al.* 2014).

Nas angiospermas, a lignina é um heteropolímero aromático complexo, derivado principalmente de três álcoois hidroxicinâmílicos (ou monolignóis): álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Estes compostos geram três monômeros de lignina: hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Boerjan *et al.* 2003; Vanholme *et al.* 2012). A proporção desses monômeros determina a composição da lignina, a qual difere entre as espécies (Ralph *et al.* 2004).

A maioria das enzimas que desempenham um papel na biossíntese da lignina foram identificadas e estão bem caracterizadas (Fraser e Chapple 2011). Mutações em vários genes da rota biossintética da lignina resultam em plantas que acumulam polímeros de lignina atípicos que não estão presentes ou não são abundantes em plantas selvagens (Anderson *et al.* 2015). A lignina é sintetizada na parede celular pela polimerização dos monolignóis catalisada por peroxidases (Fry 2001). Fenilalanina amônia liase (PAL), 4-cumarato:CoA ligase (4CL), cinamil álcool desidrogenase (CAD), cinamato 4-hidroxilase (C4H), cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), ferulato 5-hidroxilase (F5H), cinamoil-CoA redutase (CCR), ácido cafeico O-metiltransferase (COMT) e peroxidase (POX) são as principais enzimas da rota biossintética da lignina e estudos relacionados a esses genes vêm recebendo destaque na literatura nos últimos anos (Boudet *et al.* 2003; Cochrane *et al.* 2004; Do *et al.* 2007; Weng e Chapple 2010; Cheng *et al.* 2013; Zhang e Liu 2015; Hu *et al.* 2017). Entretanto, há uma lacuna no conhecimento a respeito da expressão gênica quando se trata de desenvolvimento *in vitro* fotoautotrófico, com enriquecimento de CO₂, seja pela ventilação natural ou forçada.

Além disso, ainda são necessárias informações estruturais do desenvolvimento desses componentes na parede celular (Knox 2008; Yang *et al.* 2016). Temos, portanto, apenas um conhecimento limitado da diversidade das configurações macromoleculares da parede celular *in situ* que podem ocorrer em um órgão em desenvolvimento (Harris 2005; Cosgrove 2018). Desta forma, são necessárias ferramentas adequadas para adquirir essas informações.

Atualmente, a técnica da imunohistoquímica, que utiliza anticorpos monoclonais contra epítomos específicos, é o melhor método para discernir os aspectos das microestruturas da parede celular e localizar precisamente polímeros *in situ* em tecidos complexos (Lee *et al.* 2011; Domozych 2012; Shinohara *et al.* 2015; Pilarska *et al.* 2015; Leszczuk *et al.* 2018).

Poucos são os trabalhos que utilizam a técnica de imunohistoquímica no desenvolvimento de plantas *in vitro* e, quando o fazem, são relacionados à embriogênese

ou organogênese somática (Tan *et al.* 2011; Potocka *et al.* 2012; Pilarska *et al.* 2015). Desta forma, a utilização desta técnica para elucidar a dinâmica da deposição de parede celular em vitroplantas sob condições fotoautotróficas com enriquecimento de CO₂ é desconhecida

Sabendo que a propagação *in vitro* da espécie *P. glomerata* vem sendo promissora quanto ao sistema fotoautotrófico sob atmosfera enriquecida com CO₂ e considerando o pouco conhecimento sobre a estrutura e padrões de deposição de polissacarídeos de parede celular e sobre a expressão dos genes da rota biossintética da lignina nessa espécie, foram elaboradas as seguintes hipóteses a serem investigadas neste trabalho:

- Sob condições fotoautotróficas *in vitro*, no ambiente enriquecido com CO₂, há maior alocação de carbono estrutural para a parede celular e, conseguinte, modificação de sua arquitetura.
- Há variação na dinâmica dos padrões de deposição dos componentes da parede celular em diferentes tempos de exposição ao CO₂ em *Pfaffia glomerata*.
- Há variação na expressão de genes associados aos padrões de deposição da lignina na parede celular em ambiente enriquecido com CO₂, em diferentes períodos de exposição, em *Pfaffia glomerata*.

Para isso, o presente estudo teve como objetivo analisar a dinâmica estrutural da deposição de parede celular assim como a expressão de genes envolvidos na biossíntese de parede celular em plantas de *Pfaffia glomerata* durante o cultivo *in vitro* em atmosfera enriquecida com CO₂.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

O material vegetal foi obtido através da propagação vegetativa *in vitro* via segmentos nodais, com 2 cm de comprimento, sem folhas e com dois meristemas axilares pré-existentes. Tais segmentos foram retirados de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* (acesso LCT 22) cultivadas por 30 dias sob condições fotoheterotróficas e inoculados em meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962), acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose. O meio de cultura teve pH ajustado para 5,7 e foi geleificado com 7 g L⁻¹ de ágar granulado (Merck®) posteriormente, foi esterilizado por autoclavagem a 121° C e 1,5 atm durante 20 minutos. As culturas foram mantidas a 25 ± 2° C sob irradiância de 60 µmol m⁻² s⁻¹, em lâmpada fluorescente (110 W, HO Sylvania T12) e fotoperíodo de 16 h. Este processo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCTII) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2. Análise Experimental

Para a análise experimental foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 600 mL contendo 100 mL de meio de cultura MS semis sólido com 7 g L⁻¹ de ágar granulado (Merck®), sem sacarose, contendo 4 segmentos nodais de *P. glomerata*. Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno contendo duas membranas PTFE de 0,45 µm de poro (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão), permeáveis a trocas gasosas. Os frascos foram colocados dentro de câmaras acrílicas (41 cm largura x 26 cm altura x 50 cm comprimento), sendo devidamente vedadas com sistema de presilhas tipo borboleta distribuídas na tampa. Cada câmara continha uma ventoinha para promoção da ventilação forçada e homogeneização da atmosfera no seu interior, segundo proposto por Saldanha *et al.* (2013). As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 100 µmol m⁻² s⁻¹ promovida por lâmpadas fluorescentes.

O ar enriquecido de CO₂ (uma mistura de ar ambiente com CO₂ comercial) foi injetado no interior da câmara com o fluxo de 1 L min⁻¹, com umidade relativa constante de 50 ± 10 %. As concentrações de CO₂ no ar injetado foram de 400 e 1000 µL L⁻¹, no qual foram ajustados com um analisador de gás infravermelho (modelo S153 CO₂ Analyzer Qubit System, Kingston, Canada). Também foram colocados frascos do lado de fora das câmaras de acrílico, como controle do experimento, sem atmosfera enriquecida

e sem ventilação forçada. A concentração de CO₂ do ambiente externo às câmaras de acrílico também foi avaliada com analisador de gás infravermelho.

O experimento foi avaliado aos 20, 30 e 40 dias de exposição de indivíduos de *P. glomerata* à atmosfera enriquecida de CO₂, totalizando 9 tratamentos (Tabela 1). Para cada coleta foram utilizados 4 frascos (n=4).

3. Análises de Crescimento

Para avaliar o crescimento das plantas em cada experimento foram determinados o comprimento da planta (cm) e as massas fresca (g) e seca (g) totais.

Para a determinação da massa seca as amostras foram mantidas a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar (ACB LABOR[®]), até obter peso constante. Para análise da área foliar, as folhas foram destacadas e fixadas individualmente em folhas em papel branco plastificado e milimetrado, sendo as imagens capturadas com câmera digital Nikon[®] P510, e processadas no programa Image J (Schneider *et al.* 2012).

4. Atividade fotossintética *in vitro*

As medidas de taxa de assimilação onde CO₂ da planta líquida (A), foram realizadas utilizando líquida frascos contendo 4 indivíduos de *P. glomerata*, sob diferentes concentrações de CO₂, das 10:00 às 14:00 h. As análises foram realizadas em 20, 30 e 40 dias de experimento.

Para isso, foi adaptado um sistema de analisador de gás infravermelho (IRGA) segmentado. O esquema utilizado seguiu a metodologia descrita por Costa *et al.* (2014) e como fonte de energia luminosa foi desenvolvido um sistema composto por 8 LEDs brancos disposto no interior das laterais de um recipiente de poliestireno expandido (EPS Isopor[®]). Os LEDs foram ligados em um circuito de corrente contínua sob tensão de 12 V, formados por dois conjuntos em paralelo de 4 LEDs ligados em série.

5. Imunohistoquímica

Após a finalização de cada tratamento do experimento (20, 30 e 40 dias), foram fixados caules localizados abaixo do terceiro nó de *P. glomerata* para as análises de imunolocalização.

Para tais estudos, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (0,2%) e paraformaldeído (1,6%), em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,1) (Avci *et al.* 2012). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em historresina LR White. Secções semi-finas (1-2 µm) foram obtidas em micrótomo rotativo

de avanço automático (modelo RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Foram utilizados cinco anticorpos monoclonais (Tabela 2), para imunodeteção de antígenos de parede celular primária. Após o bloqueio dos sítios de ligação não específicos através da incubação das secções em uma solução com 3% (p/v) de BSA em tampão fosfato de sódio (PBS) (pH 7,2) e lavagem das lâminas com o mesmo tampão, as secções foram incubadas com um anticorpo primário diluído (1:10) em 1% de BSA em PBS (pH 7,2) durante 1,5 h. As amostras foram lavadas novamente com PBS três vezes durante 5 minutos cada e, então, incubadas novamente com anticorpo secundário (Anti-Rat IgG ('whole molecule')-FITC) diluído (1:100) em 1% de BSA em PBS (pH 7,2) durante 1,5 h. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS como descrito acima. O controle da fluorescência de fundo foi realizado utilizando o mesmo método, porém omitindo os anticorpos primários. Algumas secções foram coradas com Calcofluor White 0,01% (Hughes e McCully, 1975), na qual ligações β -1,3 e β -1,4 glucanos emitem fluorescência branco-azulado, na presença de luz UV.

Após a secagem completa, as seções foram cobertas com uma gota de uma solução anti-desvanecimento de Citifluor (Sigma-Aldrich, EUA) e montadas com lamínula. As preparações foram examinadas imediatamente em microscópio confocal de Varredura a Laser (modelo LSM510 META, Carl Zeiss Microscopy Ltd., Jena, Germany), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM/UFV).

6. Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR

Ao completar 40 dias do experimento, amostras da parte aérea de *P. glomerata* foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em Ultrafreezer (COLDLAB; CL58-86V, Piracicaba, SP, Brasil) para a realização da expressão dos genes da rota de biossíntese da lignina: cinamato 4-hidroxilase (*PgC4H*), cafeoil-CoA O-metiltransferase (*PgCCoAOMT*), cinamoil-CoA redutase (*PgCCR*), cinamil álcool desidrogenase (*PgCAD*) e ácido cafeico O-metiltransferase (*PgCOMT*).

Para isto, foi realizada a extração do RNA total utilizando 100 mg de massa fresca vegetal com a adição de TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para evitar DNA nuclear, 10 μ g de RNA foram tratados com 1 μ L de DNase I (ThermoScientific NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade da amostra de RNA foram determinadas utilizando um Nanodrop 2000C (ThermoScientific, Wilmington, DE).

Para a reação de transcriptase reversa foi utilizado o Super Script™ III, Kit de Sistema de Síntese de Primeira Linha (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA). As reações foram feitas com 1 µg de RNA com água livre de nuclease, 1 µL de oligo(dT)₂₀ a 50 µM e 1 µL de dNTP a 10 mM, incubada durante 5 min a 65° C, incubada a 4° C por 2 min, depois adicionando 0,1 M de DTT e 1 µL da enzima SuperScript III. A solução resultante foi incubada a 50° C por 60 min, e depois a 70° C por 15 min.

As análises de qRT-PCR foram realizadas em aparelho de detecção de CFX96 Touch™ (BIO-RAD), utilizando SYBR Green I (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA) e primers para os genes da rota dos fenilpropanoides obtidos a partir de sequências do transcriptoma *de novo* de *P. glomerata* (Batista *et al.* 2018). A seleção dos primers foi realizada com o auxílio do programa Primer 3 Plus (www.bioinformatics.nl). A especificidade dos primers dos genes da rota da lignina foi verificada por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Análises da curva de melting foram realizadas para garantir tamanho único do produto de amplificação com leituras realizadas a cada incremento de 0,5 °C desde 60 °C até 95 °C. A eficiência de amplificação dos pares de primers e as diluições de trabalho foram obtidas a partir de testes de diluição de um “pool” constituído por todas as amostras de cDNA (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000).

As condições de amplificação foram: 95° C por 10 min, e 40 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 1 min. A quantificação da expressão gênica, foi realizada por métodos comparativos de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen 2001).

7. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples e em esquema fatorial 2x2 (apenas para a análise de fotossíntese). As médias foram comparadas pelos testes de Dunnett (expressão gênica) ou Tukey (demais análises), ambos a 5% de significância. Para isso, foi utilizado o programa estatístico Genes (Cruz 2013).

RESULTADOS

Avaliação da concentração de CO₂ na sala de cultivo e câmaras de enriquecimento

Ao longo do experimento, as concentrações de CO₂ foram constantemente monitoradas, buscando-se assegurar fidelidade às concentrações propostas para este estudo. Porém, as concentrações médias de CO₂ na sala de cultivo, local onde foram cultivadas as plantas do tratamento controle, encontraram-se, em todo o momento, superiores às encontradas no interior da câmara com concentração controlada de 400 µL L⁻¹ de CO₂. As médias para os tratamentos com ventilação forçada foram de acordo com as concentrações estabelecidas previamente (Tabela 3).

Altas concentrações de CO₂ induzem maior crescimento em *Pfaffia glomerata*

O enriquecimento de CO₂ foi efetivo para aumentar o comprimento da planta e o acúmulo de massa vegetal apenas no tratamento de 1000 µL L⁻¹ de CO₂, compreendendo as médias mais altas. As médias do tratamento controle, sem ventilação forçada de CO₂, não diferiram estatisticamente do tratamento (com ventilação forçada) de 400 µL L⁻¹ de CO₂ em todos os parâmetros, independente do tempo de exposição (Figura 1 e Tabela 4).

A taxa fotossintética em *P. glomerata* foi aumentada com maior concentração e tempo de exposição ao CO₂

Embora tenham sido avaliadas as taxas de assimilação de carbono (*A*) em cada um dos 9 tratamentos, ao realizar a análise de variância, em esquema fatorial, não houve significância para a interação dos fatores (tratamento x tempo), apenas com os fatores isolados. Entre as concentrações de CO₂ estudadas, apenas a de 1000 µL L⁻¹ mostrou maior taxa fotossintética média, cerca de 24% a mais do que os demais tratamentos, independente do tempo de exposição a essa concentração. Quanto ao tempo de exposição ao CO₂, 40 dias foi o tratamento que apresentou maiores médias, independente da concentração de CO₂ utilizada (Tabela 5).

A expressão dos genes relacionados à via biossintética de lignina em *Pfaffia glomerata* é modulada pelo CO₂

Foi monitorada a expressão de cinco genes relacionados à via de síntese de lignina, presentes na rota dos fenilpropanoides. Um resumo dessas vias com os principais metabólitos e enzimas é mostrado na Figura 2.

O gene *PgC4H* apresentou menor expressão nos tratamentos com ventilação forçada comparado ao controle. No tratamento de 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂, a expressão chegou a ser 20 vezes menor em relação ao controle, enquanto que no tratamento com 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ a expressão foi reduzida pela metade. O gene *PgCAD* também apresentou redução significativa na sua expressão nos tratamentos com ventilação forçada, com expressão cinco vezes menor a 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ e quatro vezes menor no tratamento com 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂. O mesmo ocorreu com *PgCCR*, onde a redução da expressão foi de aproximadamente 8 vezes no tratamento com 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ e 4,5 vezes menor no de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂.

Os genes *PgCCoAOMT* e *PgCOMT* não apresentaram diferença significativa em seus níveis de expressão em relação ao controle (Figura 2).

Imunohistoquímica da parede celular em *P. glomerata* mostra que há mais deposição de hemiceluloses quando expostas a altas concentrações de CO₂

Foram analisados cinco anticorpos monoclonais (Tabela 2) no caule de indivíduos de *P. glomerata* expostos a diferentes concentrações de CO₂. Foi realizado também teste com Calcofluor White, além do teste de controle negativo, realizado sem a presença do anticorpo primário, visando detectar regiões com autofluorescência ou marcadas com o anticorpo secundário. Com o controle negativo foi observado que os cloroplastos e a cutícula mostraram grande marcação fluorescente, e desta forma, esses dados não foram considerados para este trabalho.

Para mostrar de forma geral toda a extensão das células do caule de *P. glomerata*, secções transversais foram coradas com Calcofluor White, o qual é específico para as ligações β -glicano, como é encontrado nas moléculas de celulose e xiloglucano (Figura 3 A-D).

A detecção de pectinas do grupo dos Homogalacturonanos ocorreu com a utilização do anticorpo JIM7, para o qual foi observado que, entre todos os tratamentos, aos 20 dias houve maior marcação nas regiões da epiderme, colênquima, feixe vascular e

medula do caule (Figuras 4A e 5A). Porém, aos 30 e 40 dias a marcação tendeu a se restringir nas regiões colenquimáticas e feixe vascular, principalmente nas células do floema. Essa tendência se estendeu para todos os tratamentos com CO₂, não havendo diferença entre eles (Figuras 4B e 5B).

Já a detecção de pectinas do grupo dos Ramnogalacturonanos foi analisada por meio da utilização do anticorpo LM5, no qual a marcação foi bem fraca em todos os tratamentos (Figuras 4C-D e 5C), diferindo apenas no tratamento de 1000 µL L⁻¹ de CO₂, em que aos 40 dias a marcação ficou mais intensa na região do xilema (Figura 5D).

A deposição de hemiceluloses do grupo das Heteroxilanas foi detectada com a utilização dos anticorpos LM10 e LM11, os quais apresentaram padrões muito semelhantes, diferindo apenas na intensidade da marcação, em que o anticorpo LM10 mostrou maior intensidade do que o LM11. O padrão de deposição de Heteroxilanas foi gradual e exclusiva nas regiões de parede secundária, sendo menor aos 20 dias (Figuras 4E,G e 5E,G) e maior aos 40 dias em todos tratamentos (Figuras 4F,H e 5F,H). O tratamento com 1000 µL L⁻¹ de CO₂ foi o mais expressivo.

Os proteoglicanos do tipo Arabinogalactano (AGPs) foram detectados através da utilização do anticorpo JIM13, apresentando marcação nas regiões de parede secundária, principalmente no xilema. Em todos os tratamentos, a marcação foi maior aos 40 dias (Figura 3F e 3H) e menor aos 20 dias (Figura 3E e 3G), sendo que o tratamento com 1000 µL L⁻¹ de CO₂ foi, novamente, o que foi marcado com maior intensidade.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que elevadas concentrações de CO₂ no ambiente *in vitro* levam ao aumento do desenvolvimento das plantas de *Pfaffia glomerata*. Este estudo é o primeiro a relatar interações entre o enriquecimento com CO₂ e a expressão dos genes relacionados à rota de biossíntese da lignina, utilizando vitroplantas de *P. glomerata*, uma espécie de relevante importância medicinal e com destacado potencial para o cultivo fotoautotrófico.

Os resultados encontrados em todas as variáveis de crescimento das plantas mostraram como o enriquecimento de CO₂ com 1000 µL L⁻¹ aumenta o crescimento das plantas *in vitro*, conforme já havia sido relatado por Saldanha *et al.* 2014. Porém não houve diferença entre os tratamentos de ventilação forçada de 400 µL L⁻¹ de CO₂ e o tratamento controle, no qual as plantas foram mantidas fora das caixas e sob ventilação natural. A falta de diferença entre tais tratamentos se deu, provavelmente, pelas altas concentrações de CO₂ no interior da sala de cultivo *in vitro*, com valores quase 1,5 vezes maiores que aqueles do tratamento de 400 µL L⁻¹ de CO₂. Uma das principais características das salas de cultivo *in vitro* é o fato de serem vedadas, muitas vezes sem janelas, com o objetivo de assegurar o isolamento do ambiente externo, possibilitando o controle da intensidade luminosa, da temperatura e, principalmente, de evitar que contaminantes possam inviabilizar as culturas *in vitro* (Kozai *et al.* 2016). Este fato possibilita que altas concentrações de CO₂ sejam encontradas no interior das mesmas.

Os dados de fotossíntese reforçaram os resultados obtidos nas análises de crescimento, uma vez que com maiores taxas fotossintéticas no parâmetro de 1000 µL L⁻¹ de CO₂, as plantas se desenvolveram mais em relação aos demais tratamentos (Figura 1). O aumento da fotossíntese em plantas expostas à atmosfera enriquecida com CO₂ é bem documentado na literatura (Oliveira *et al.* 2010; Saldanha *et al.* 2014; Pérez-Jiménez *et al.* 2017; Sanches *et al.* 2017). Níveis elevados de CO₂, em plantas de metabolismo C3 em geral, causam incrementos no crescimento e biomassa nas plantas, aumentando a fotossíntese e a eficiência do uso da água (Long *et al.* 2004; Saldanha *et al.* 2014; Corrêa *et al.* 2016). Tal enriquecimento aumenta a quantidade de CO₂ que se difunde no interior da folha, favorecendo o aumento da razão de CO₂/O₂ para a enzima Rubisco, aumentando, assim, sua eficiência de carboxilação (Robredo *et al.* 2007; Kirschbaum 2011). Portanto, o CO₂ elevado estimula a taxa de fotossíntese e reduz a taxa de fotorrespiração, diminuindo o estresse oxidativo.

A biossíntese da lignina apresenta uma via complexa nas plantas e não está totalmente claro se uma única rota pode explicar a biossíntese em todas as espécies, em todos os tecidos e sob condições variadas de estresse ambiental (Hu *et al.* 2017). Uma rota geral da biossíntese da lignina foi inferida a partir de estudos em diversas espécies (Weng e Chapple 2010), a qual foi utilizada para este trabalho. Foram analisados, pela primeira vez, cinco genes da rota de biossíntese da lignina em *P. glomerata* em desenvolvimento sob atmosfera enriquecida com CO₂, sendo eles *PgC4H*, *PgCAD*, *PgCCR*, *PgCCoAOMT* e *PgCOMT*.

A expressão gênica da rota biossintética da lignina varia de acordo com o estímulo e a espécie analisada. Podemos observar na literatura que ao silenciar ou regular negativamente genes da rota da lignina, há a formação de plantas mutantes com baixa produção de lignina, porém sem alterar a biomassa, uma importante estratégia da engenharia genética para a produção de plantas forrageiras com melhor digestibilidade e otimização de matéria-prima para a produção de biocombustíveis (Scully *et al.* 2015; Tu *et al.* 2010; Yoo *et al.* 2018) e produção de polpa de celulose e papel (Sykes *et al.* 2015).

Embora não tenham sido desenvolvidos *in vitro*, alguns trabalhos relacionando a expressão de genes da biossíntese da lignina em plantas cultivadas sob altas concentrações de CO₂ já foram desenvolvidos, relatando não haver padrão quanto à indução ou supressão dos genes. No trabalho de Liu *et al.* (2018) pode-se observar a regulação positiva de 12 genes envolvidos no metabolismo da lignina, com consequente aumento na produção de lignina nas folhas de aipo, quando expostas à atmosfera enriquecida com 1000 µL L⁻¹ de CO₂. Porém, Souza *et al.* (2008) demonstraram que, em 36 genes analisados, 22 foram induzidos e 14 reprimidos, sendo que entre os reprimidos pode-se encontrar um gene relacionado à rota biossintética da lignina (*COMT*). Embora tenha sido o único gene analisado da rota, foi observado que havia pouca produção de lignina e maior acúmulo de celulose nas folhas de cana-de-açúcar cultivadas em altas concentrações de CO₂. Esses trabalhos indicaram, assim, que a resposta ao enriquecimento de CO₂ em relação à expressão dos genes da rota de biossíntese da lignina é inerente para cada espécie.

Ao analisar a expressão dos genes *PgC4H*, *PgCAD* e *PgCCR* na parte aérea de *P. glomerata*, pode ser observada diminuição na expressão dos mesmos. Porém houve acúmulo de biomassa, como pode ser observado nos dados de crescimento e fotossíntese, com o aumento de produção de massa seca nos indivíduos cultivados sob atmosfera enriquecida com 1000 µL L⁻¹ de CO₂. A diminuição da expressão desses genes da rota da

lignina foi relatada na literatura, mostrando que ao regular negativamente alguns genes da rota, ocorre a diminuição da concentração de lignina nas paredes secundárias, porém há o incremento da biossíntese de polissacarídeos, seja de parede celular (Tu *et al.* 2010, Sykes *et al.* 2015, Ponniah *et al.* 2017, Kasirajan *et al.* 2018) e/ou de acúmulo de amido em grãos (Ponniah *et al.* 2017).

Além da lignina, a parede celular vegetal contém proteínas e, principalmente, polissacarídeos, os quais compoem a maior parte da sua constituição. Na análise de imunohistoquímica foram utilizados quatro anticorpos monoclonais que detectam polissacarídeos de parede celular, sendo eles JIM7, LM5, LM10 e LM11 e um anticorpo monoclonal que detecta proteoglicanos, JIM13. Com esta análise, pode-se observar um padrão geral onde houve maior imunomarcção e, portanto, maior deposição de parede celular ao final do experimento, destacando sempre o tratamento com 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . Este tratamento, visualmente, obteve maior acúmulo de polissacarídeos de parede, corroborando novamente os dados de crescimento e fotossíntese.

Polímeros pécticos do tipo homogalacturonanos, apresentam grande variação de metil-esterificação, responsáveis pela regulação iônica, hidratação e estados de gel da matriz da parede celular (Ridley *et al.* 2001). A detecção de pectinas altamente metil-esterificadas nas paredes primárias foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal JIM7. Van Cutsem e Messiaen (1994) e Morris *et al.* (2000) observaram que havia pouca rigidez na parede celular, quando o grau de metil-esterificação era maior, facilitando a expansão da parede celular durante o processo de crescimento. Sabendo-se disso, é de se esperar maior imunomarcção, como de fato ocorreu, aos 20 dias de desenvolvimento, uma vez que as células do caule dos indivíduos de *P. glomerata* ainda estão em crescimento e expansão. Entretanto, aos 40 dias foi observado, em todos os tratamentos, que as células contendo pectinas metil-esterificadas se limitaram à região do feixe vascular e em algumas regiões do colênquima, sendo provável se considerar um processo de desmetil-esterificação das pectinas, realizada pela enzima pectina metilesterase (PME), alterando sua composição química e aumentando a rigidez das paredes (Geng *et al.* 2017).

Experimentos, entretanto, mostraram um efeito contrário de afrouxamento da parede celular quando ocorre a desmetil-esterificação dos homogalacturonanos em células jovens do meristema (Peaucelle *et al.* 2011) ou no desenvolvimento de hipocótilo (Peaucelle *et al.* 2015). Não se compreende, ao certo, como a desmetil-esterificação da pectina pode promover o enrijecimento ou o afrouxamento da parede. Um recente trabalho indicou que isso pode estar relacionado à especificidade das isoformas das PMEs

envolvidas, as quais podem reconhecer diferentes populações de homogalacturonanos (por exemplo, ligadas a celulose ou não) que afetam diferencialmente a mecânica de paredes (Voxeur e Höfte 2016).

Os polissacarídeos pécnicos do tipo Ramnogalacturonano-I são heteropolímeros compostos da unidade dissacarídica (1→2)- α -L-Rha-(1→4)- α -D-GalA, onde suas cadeias laterais são ricas do oligossacarídeo neutro (1→4)- β -D-galactano (reconhecido pelo anticorpo monoclonal LM5). É amplamente aceito que os polissacarídeos pécnicos contendo Ramnogalacturonano-I estejam envolvidos na adesão célula-célula e na porosidade da parede celular, seja ela primária ou secundária (Willats *et al.* 2001; Orfila e Knox 2000; Liwanag *et al.* 2012). Além disso, o aumento das cadeias laterais de (1→4)- β -D-galactano pode conferir resistência mecânica à parede celular, como foi observado no trabalho de Ulvskov *et al.* (2005), onde batatas transgênicas que expressam galactanase fúngica apresentaram células do tubérculo mais frágeis. No trabalho de McCartney *et al.* (2000), cotilédones de ervilha se tornaram mais resistentes à força mecânica externa no momento de acúmulo de (1→4)- β -D-galactano. Nas células precursoras de elementos traqueais, o (1→4)- β -D-galactano pode fornecer resistência mecânica às células e permitir que aumentem rapidamente sem romper antes que a parede secundária seja formada e comece a se espessar. Porém, ao final do processo de diferenciação, foi constatado a ausência das cadeias laterais de (1→4)- β -D-galactano, sugerindo que as mesmas sejam degradadas no decurso da diferenciação (Shinohara *et al.* 2015). Outra característica atribuída às cadeias de (1→4)- β -D-galactano é a hidrofobicidade, comprovada pela eficaz reidratação da mucilagem de sementes de *Arabidopsis* quando essas cadeias são removidas (Dean *et al.* 2007).

No presente trabalho, o anticorpo LM5 detectou o aumento de deposição desse tipo de pectina no tratamento com 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 mesmo havendo diferenciação dos vasos do xilema, não ocorreu degradação das cadeias de (1→4)- β -D-galactano, e como houve supressão dos genes de biossíntese da lignina, o aumento da deposição de Ramnogalacturonano I é essencial para a garantia de hidrofobicidade desses elementos.

Os xilanos ou heteroxilanos são compostos de uma cadeia principal de β -1,4-xilano (reconhecida pelos anticorpos monoclonais LM10 e LM11) e são as hemiceluloses mais abundantes nas paredes celulares secundárias das plantas vasculares, com sua abundância relativa dependendo da linhagem da planta, tecido ou tipo celular (Harris 2005; Scheller e Ulvskov 2010; Donaldson e Knox 2012).

A imunomarcação realizada pelos anticorpos LM10 e LM11 mostrou que houve maior deposição desse polissacarídeo no final dos 40 dias de experimento, sendo que o tratamento de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ foi o que apresentou maior deposição. A maior deposição de cadeias de β -1,4-xilano foi identificada nas regiões do xilema e em células esclerificadas, como fibras do floema (Figura 4). No trabalho de Lee *et al.* (2011), foi mostrado que, ao regular negativamente genes que expressam xilanos em *Populus trichocarpa*, as células do xilema secundário do caule se mostraram deformadas e com baixa resistência, confirmando a importância desse polissacarídeo na estrutura da parede secundária. A partir do momento que houve supressão na produção de lignina em nosso trabalho, o aporte de heteroxilanos na estrutura dos elementos de vaso do xilema e fibras de sustentação foi fundamental para a manutenção da resistência mecânica que essas estruturas exercem.

Foi estabelecido que proteínas específicas estão envolvidas na síntese da parede celular, contribuindo para a estabilização do citoesqueleto de actina e estão associadas a mudanças no conteúdo de sólidos solúveis (Shi *et al.* 2014). Além disso, como componentes dinâmicos da parede celular, essas proteínas são reguladas positivamente por fitormônios, como auxinas e citocininas (Seifert e Roberts 2007). Tais proteínas são ricas em arabinogalactanos (AGPs) e são classificados como uma categoria da superfamília de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Entre as AGPs, há membros altamente glicosilados encontrados em células em todo o reino vegetal, atuando como agentes de ligações covalentes cruzadas na rede de polissacarídeos-proteoglicanos, tais como Homogalacturonanos, Ramnogalacturonanos I e Xilanos (Tan *et al.* 2013; Hijazi *et al.* 2014).

As AGPs foram detectadas neste trabalho com a utilização do anticorpo monoclonal JIM13 que reconhece as ligações $\text{GlcA-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)-GalA-}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{2)-Rha}$ dos proteoglicanos (Yates *et al.* 1996). Foi observado que as AGPs estão vinculadas, principalmente, às regiões de feixe vascular e elementos esclerificados (Figura 3). Gao e Showalter (2000) também detectaram AGPs nos elementos traqueais do xilema e as destacaram como um marcador biológico para espessamento de parede na diferenciação celular do feixe vascular.

O cálcio é importante na preservação das propriedades mecânicas da parede celular (Cybulska *et al.* 2012). Lamport e Várnai (2013) descreveram a propriedade de AGPs como quelantes de cálcio, que controlam sua liberação em condições específicas. AGP- Ca^{2+} firmemente ligados tem a capacidade de criar um capacitor ao redor da célula

e fornecer um reservatório periplasmático de Ca^{2+} (Lamport *et al.* 2014), lembrando que o cálcio é um importante elemento para a construção de pontes na rede de celulose-hemicelulose (Carpita e Gibeaut 1993). Destacando que o maior aporte de AGPs foi detectado aos 40 dias de desenvolvimento em ambos os tratamentos, o alto conteúdo de AGPs em elementos traqueais e células de esclerênquima no caule de *P. glomerata* também pode estar associado à sua capacidade de se ligar ao cálcio e, portanto, ter um impacto sobre as propriedades mecânicas das paredes celulares formando tecidos fortalecidos (Leszczuk *et al.* 2018). Assim, a localização de AGPs na superfície interna das células do esclerênquima (Figura 3) pode corresponder ao estabelecimento das propriedades típicas de reforço para esse tipo de tecido, uma vez que há baixa expressão nos genes da rota biossintética da lignina.

Pela primeira vez foram realizadas análises de expressão gênica e de imunohistoquímica em *Pfaffia glomerata*, podendo, assim, concluir que o desenvolvimento *in vitro* de *P. glomerata*, em meio fotoautotrófico com atmosfera enriquecida com CO_2 , promoveu maiores taxas fotossintéticas, e conseqüentemente, maior crescimento e acúmulo de biomassa. Houve diminuição nos níveis de expressão, dos genes da via de síntese da lignina, o que não trouxe danos ao desenvolvimento das plantas, uma vez que o metabolismo do carbono foi redirecionado para as estruturas de parede primária e reforço das células com parede secundária, já que a produção da lignina se apresentou diminuída.

Podemos concluir também que atingimos nossos objetivos, ao confirmar as hipóteses previamente estabelecidas para este trabalho:

- Sob condições fotoautotróficas *in vitro*, no ambiente enriquecido com CO_2 , há maior alocação de carbono estrutural para a parede celular e, conseqüente, modificação de sua arquitetura.
- Há variação na dinâmica dos padrões de deposição dos componentes da parede celular ao serem expostas ao CO_2 em *Pfaffia glomerata*.
- Há variação na expressão de genes associados aos padrões de deposição da lignina na parede celular em ambiente enriquecido com CO_2 em *Pfaffia glomerata*.

Este trabalho pioneiro contribuiu para melhor compreensão de como a expressão dos genes da rota de biossíntese da lignina pode ser modulado por fatores externos, como o enriquecimento de CO_2 em sistema fotoautotrófico *in vitro*, e também para elucidar a

dinâmica de deposição de parede celular primária, quando há baixa expressão de genes da síntese de lignina. Estes resultados abrem possibilidades para o desenvolvimento de futuros estudos, com novas abordagens, incluindo: outros genes relacionados à rota de síntese da lignina, análises da expressão dos genes em tempos de cultivo diferentes, quantificação dos compostos estruturais da parede celular e novos anticorpos de parede celular a fim de esclarecer com mais precisão a composição das paredes celulares, inclusive utilizando técnicas de imunocitoquímica.

TABELAS

Tabela 1. Tratamentos utilizados na avaliação do desempenho de *Pfaffia glomerata* cultivada em ambiente enriquecido com CO₂.

Tratamento	Dias de exposição ao CO ₂	CO ₂ (μL L ⁻¹)
1	20	Controle
2	20	400
3	20	1000
4	30	Controle
5	30	400
6	30	1000
7	40	Controle
8	40	400
9	40	1000

Tabela 2. Relação dos Anticorpos Monoclonais e seus respectivos epítomos na avaliação do desenvolvimento estrutural de *Pfaffia glomerata* cultivada em ambiente enriquecido com CO₂.

Polissacarídeo	Anticorpo Monoclonal	Epítomo	Referência
Pectina (Homogalacturonano)	JIM 7	Pectinas Metil-esterificadas	Clausen et al. 2003
Proteoglicano (Arabinogalactano)	JIM 13	GlcA-β-(1→3)-GalA-α-(1→2)-Rha	Yates et al. 1996
Pectina (Ramnogalacturonano I)	LM 5	(1→4)-β-D-galactano	Jones et al. 1997
Hemicelulose (Heteroxilano)	LM10 LM 11	(1→4)-β-D-xilano (1→4)-β-D-xilano/arabinoxilano	McCartney et al. 2005

Tabela 3. Concentração média de CO₂ e erro padrão ao longo de 40 dias.

Tratamento	CO ₂ (μL L ⁻¹)
Controle	538.875 ± 59.894
CO ₂ 400 μL L ⁻¹	402.218 ± 09.786
CO ₂ 1000 μL L ⁻¹	1031.700 ± 56.559

Tabela 4. Parâmetros médios de crescimento, com erro padrão, de *Pfaffia glomerata* avaliados em 20, 30 e 40 dias de cultivo.

Tratamento	Tempo (dias)	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	Comprimento (cm)
Controle	20	0.789 ± 0.099 B	0.048 ± 0.003 B	5,053 ± 0,412 B
CO ₂ 400 µL L ⁻¹	20	0.711 ± 0.095 B	0.040 ± 0.003 B	5,400 ± 0,211 AB
CO ₂ 1000 µL L ⁻¹	20	1.286 ± 0.116 A	0.072 ± 0.004 A	6,882 ± 0,513 A
Controle	30	2.115 ± 0.326 B	0.128 ± 0.016 B	11,031 ± 0,985 B
CO ₂ 400 µL L ⁻¹	30	1.947 ± 0.188 B	0.115 ± 0.010 B	13,279 ± 1,703 B
CO ₂ 1000 µL L ⁻¹	30	3.922 ± 0.217 A	0.229 ± 0.011 A	18,930 ± 1,096 A
Controle	40	2.698 ± 0.659 B	0.203 ± 0.013 B	16.068 ± 1.272 B
CO ₂ 400 µL L ⁻¹	40	1.774 ± 0.293 B	0.191 ± 0.006 B	16.839 ± 0.814 B
CO ₂ 1000 µL L ⁻¹	40	5.152 ± 0.440 A	0.381 ± 0.014 A	22.527 ± 1.127 A

Médias que apresentam a mesma letra não diferem no teste de Tukey a 5% de probabilidade (p < 0.05).

Tabela 5. Parâmetros médios da taxa fotossintética, com erro padrão, de *Pfaffia glomerata* exposta a atmosfera enriquecida com CO₂, avaliados em 20, 30 e 40 dias de cultivo.

Tratamento	A (µmol cm ⁻² s ⁻¹)	Tempo	A (µmol cm ⁻² s ⁻¹)
Controle	0,2424 ± 0,069 B	20 dias	0,1575 ± 0,029 B
CO ₂ 400 µL L ⁻¹	0,2462 ± 0,043 B	30 dias	0,3117 ± 0,023 B
CO ₂ 1000 µL L ⁻¹	0,3035 ± 0,048 A	40 dias	0,3228 ± 0,016 A

Médias que apresentam a mesma letra não diferem no teste de Tukey a 5% de probabilidade (p < 0.05).

FIGURAS

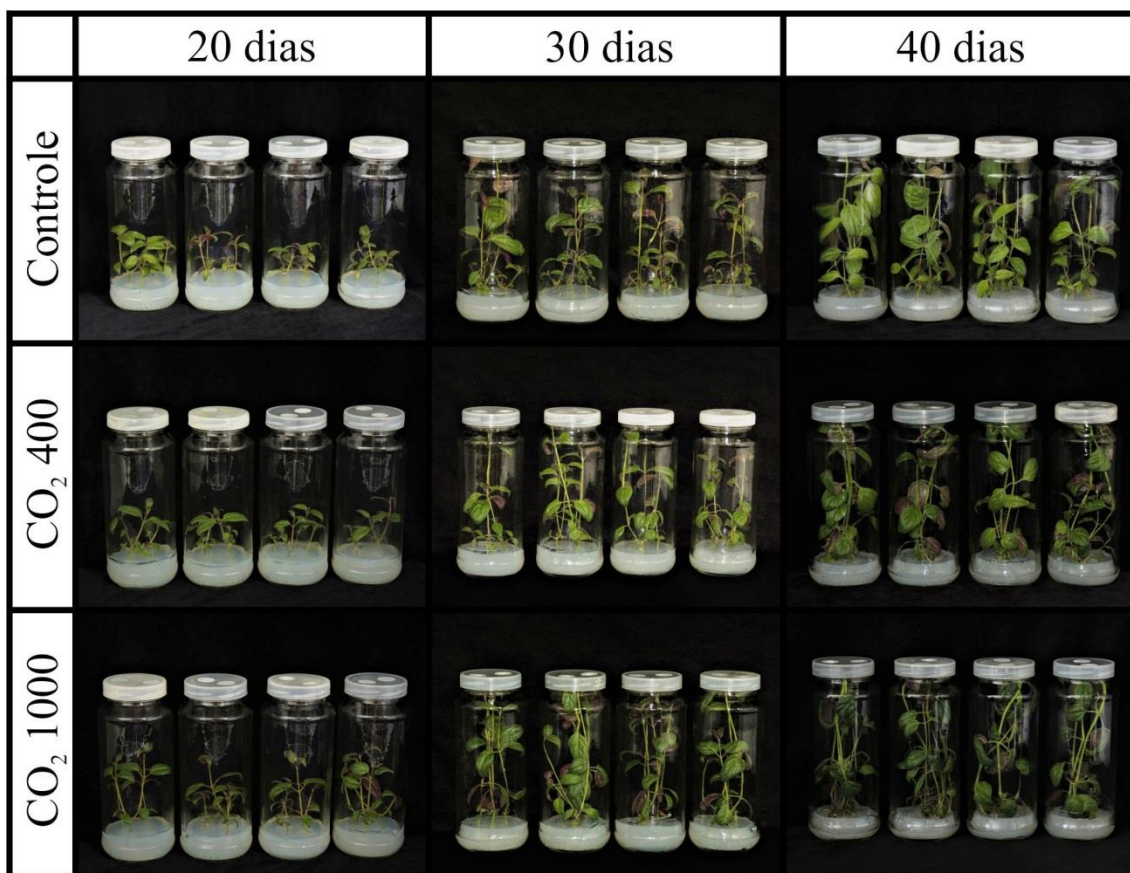


Figura 1. Experimento com *Pfaffia glomerata*, após 40 dias de desenvolvimento *in vitro* com enriquecimento de CO₂ em três concentrações distintas: controle (CO₂ presente na sala de crescimento, sem ventilação forçada), 400 µL L⁻¹ e 1000 µL L⁻¹, ambos dispostos em câmaras de acrílico com ventilação forçada.

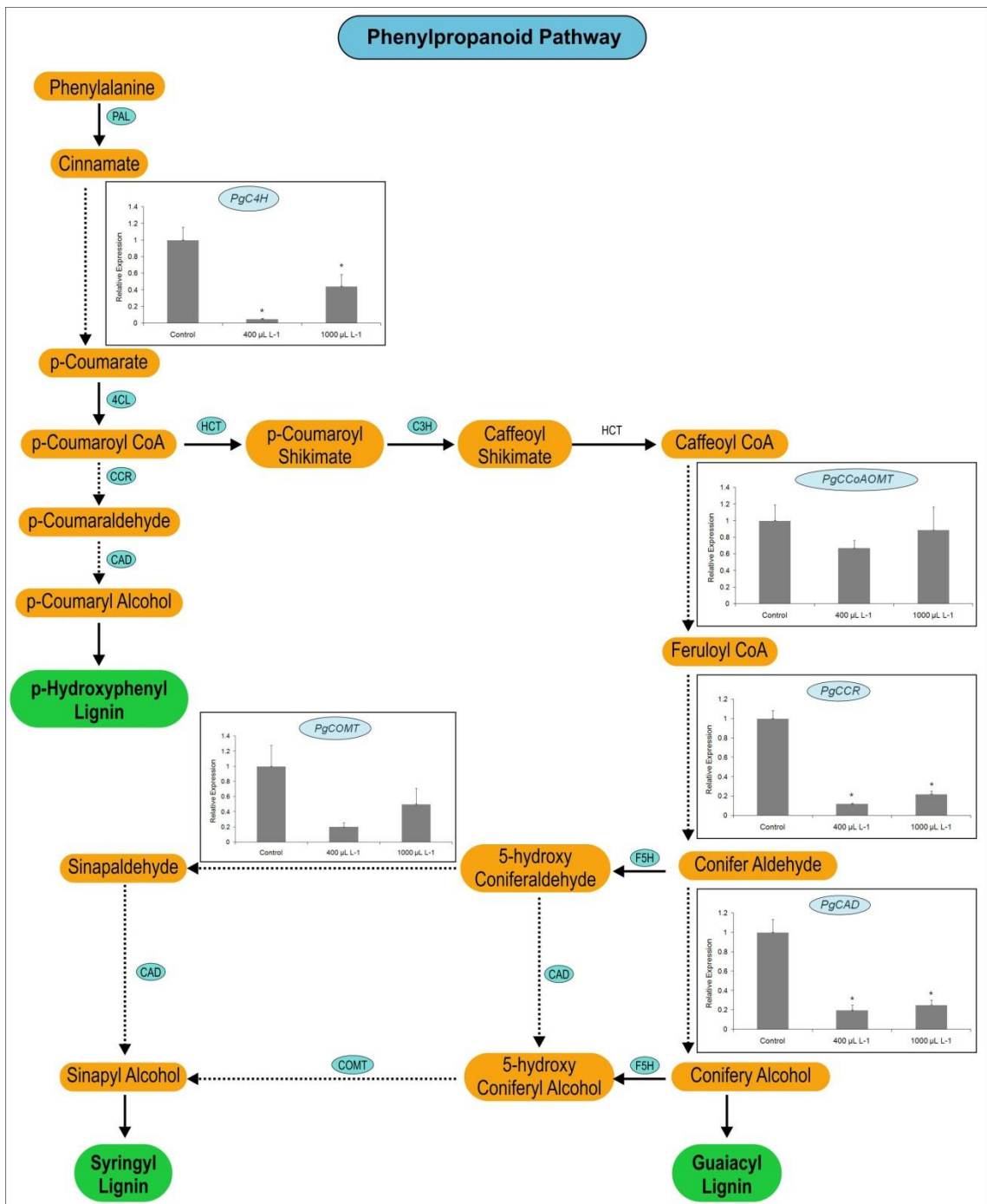


Figura 2. Rota simplificada de biossíntese dos fenilpropanoides, mostrando a expressão dos cinco genes estudados nesse trabalho (*PgC4H*, *PgCCR*, *PgCAD*, *PgCoAOMT* e *PgCOMT*) em vitroplantas de *Pfaffia glomerata* desenvolvidas em diferentes concentrações de CO₂, aos 40 dias de cultivo *in vitro*. As setas pontilhadas destacam o local de atuação dos mesmos genes analisados, porém sem a demonstração gráfica dos mesmos.

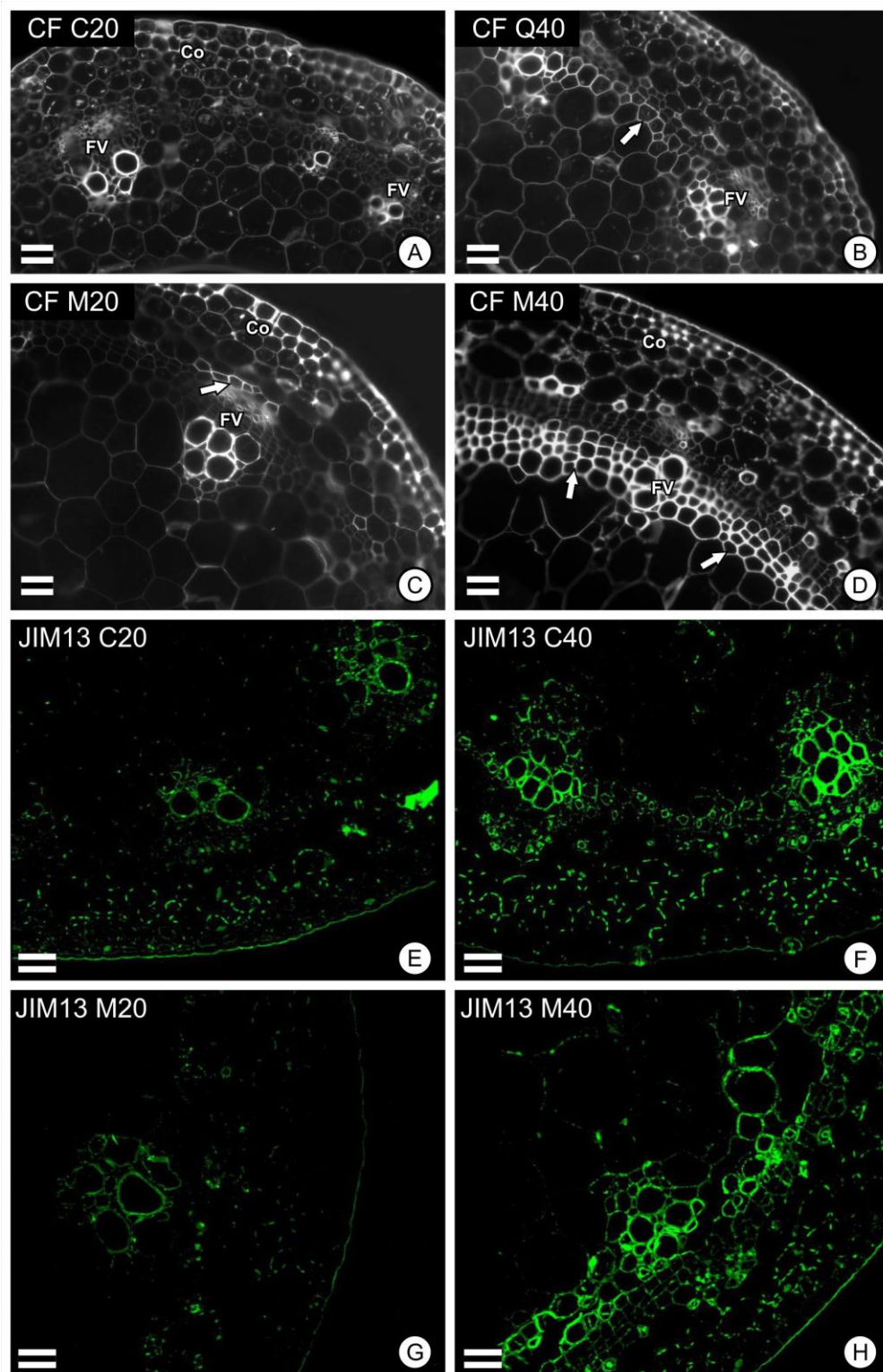


Figura 3. Teste histoquímico com Calcofluor White e imunohistoquímico com o anticorpo monoclonal JIM13 em cortes transversais do caule de *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de CO₂. **A.** Calcofluor aos 20 dias Tratamento Controle; **B.** Calcofluor aos 40 dias Tratamento 400 µL L⁻¹; **C.** Calcofluor aos 20 dias Tratamento 1000 µL L⁻¹; **D.** Calcofluor aos 40 dias Tratamento 1000 µL L⁻¹; **E.** JIM13 aos 20 dias Tratamento Controle; **F.** JIM13 aos 40 dias Tratamento Controle; **G.** JIM13 aos 20 dias Tratamento 1000 µL L⁻¹; **H.** JIM13 aos 40 dias Tratamento 1000 µL L⁻¹. Abreviaturas: FV = Feixe Vascular; Co = Colênquima; Setas = Fibras. Barras = 50 µm.

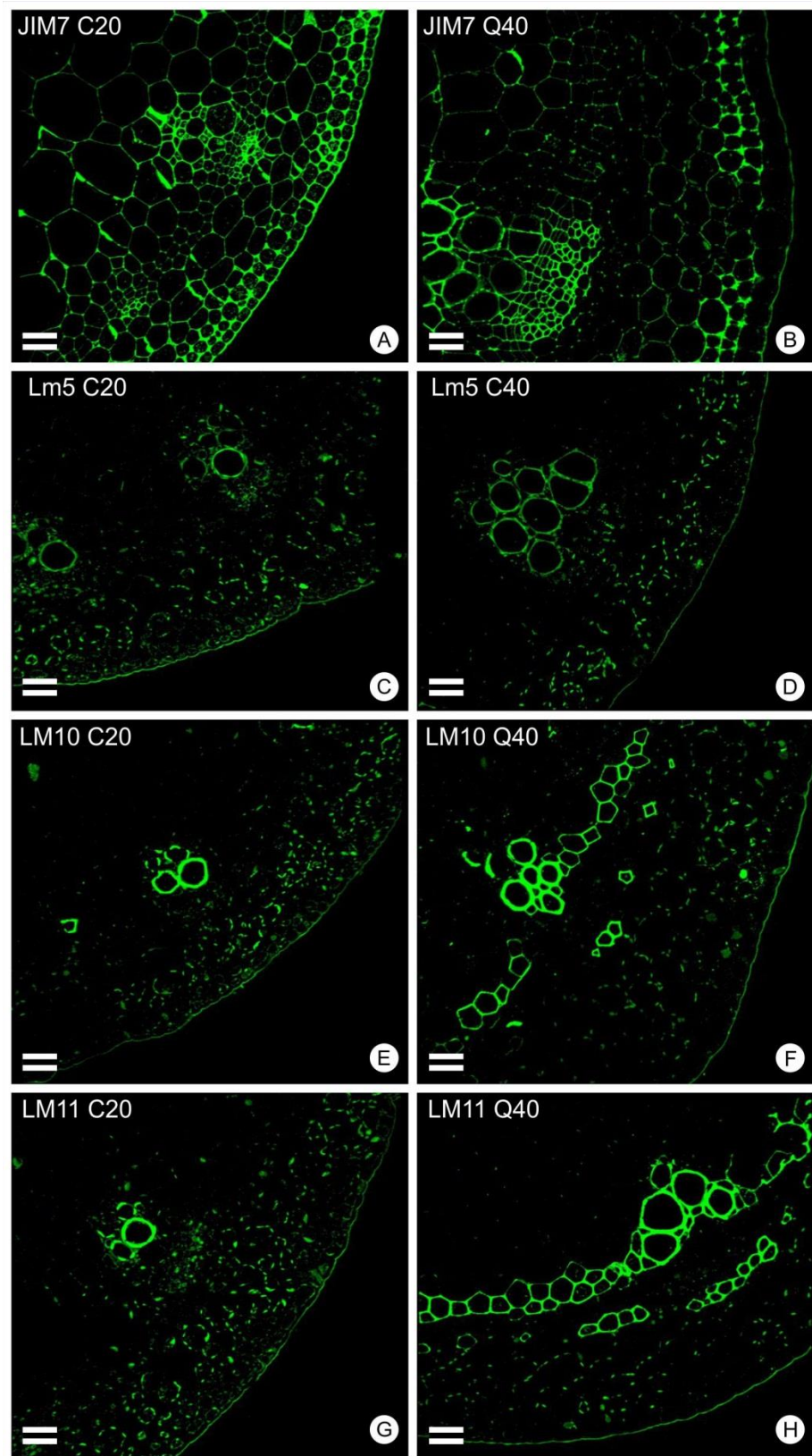


Figura 4. Imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais (JIM7, LM5, LM 10 e LM11) em cortes transversais do caule de *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de CO₂. **A.** JIM7 aos 20 dias Tratamento Controle; **B.** JIM7 aos 40 dias Tratamento 400 µL L⁻¹; **C.** LM5 aos 20 dias Tratamento Controle; **D.** LM5 aos 40 dias Tratamento Controle; **E.** LM10 aos 20 dias Tratamento Controle; **F.** LM10 aos 40 dias Tratamento 400 µL L⁻¹; **G.** LM11 aos 20 dias Tratamento Controle; **H.** LM11 aos 40 dias Tratamento 400 µL L⁻¹. Barras = 50 µm

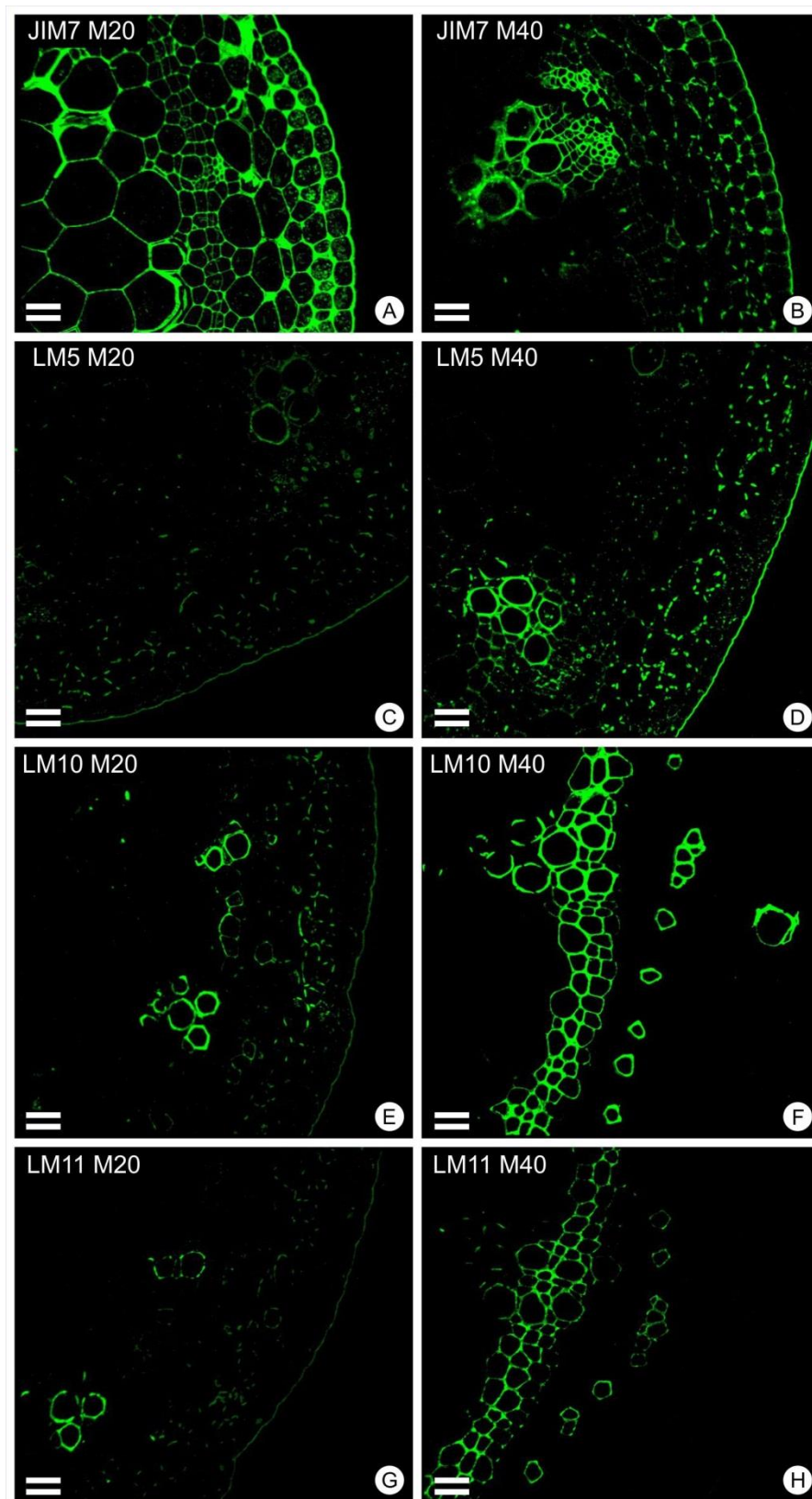


Figura 5. Imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais (JIM7, LM5, LM10 e LM 11) em cortes transversais do caule de *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro* sob em $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 . **A.** JIM7 aos 20 dias; **B.** JIM7 aos 40 dias; **C.** LM5 aos 20 dias; **D.** LM5 aos 40 dias; **E.** LM10 aos 20 dias; **F.** LM10 aos 40 dias; **G.** LM11 aos 20 dias; **H.** LM11 aos 40 dias. Barras = $50 \mu\text{m}$.

Referências Bibliográficas

- Almeida I.V., Düsman E., Mattge G.I., Toledo F., Reusing A.F., Vicentini V.E.P. 2017. *In vivo* antimutagenic activity of the medicinal plants *Pfaffia glomerata* (Brazilian ginseng) and *Ginkgo biloba*. *Genetics and Molecular Research* 16: 1-11.
- Alves R.B.N., Mendes R.A., Mendes M.A., Carneiro R.M.D.G., Silva D.B., Cardoso L.D., Salomão A.N., Vieira R.F. 2006. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8: 1-4.
- Anderson N.A., Tobimatsu Y., Ciesielski P.N., Ximenes E., Ralph J., Donohoe B.S., Ladisch M., Chapple C. 2015. Manipulation of Guaiacyl and Syringyl Monomer Biosynthesis in an Arabidopsis Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Mutant Results in Atypical Lignin Biosynthesis and Modified Cell Wall Structure. *The Plant Cell* 27: 2195-2209.
- Avci U., Pattathil S., Hahn M.G. 2012. Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: immunolocalization of glycan epitopes. *In: Himmel M.E. (Ed.), Biomass Conversion: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, p. 73.
- Baba K. 2006. Models of plant cell walls. *In: Hayashi T. (Ed.), The science and lore of the plant cell wall. Biosynthesis, structure and function*. Brown Walker Press, Boca Raton, pp. 3-10.
- Batista D.S., Castro K.M., Koehler A.D., Porto B.N., Silva A.R., Souza V.C., Teixeira M.L., Cardoso M.G., Santos M.O., Viccini L.F., Otoni W.C. 2017. Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128: 357-368.
- Batista D.S., Koehler A.D., Romanel E., Souza V.C., Silva T.D., Almeida M.C., Maciel T.E.F., Ferreira P.R.B., Felipe S.H.S., Saldanha C.W., Maldaner J., Dias L.L.C., Festucci-Buselli R.A., Otoni W.C. 2018. *De novo* assembly and transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450 family genes in 20-hydroxyecdysone production. *Protoplasma* (in press).
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.
- Boudet A.M., Kajita S., Grima-Pettenati J., Goffner D. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8: 576-581.
- Burton R.A., Gidley M.J., Fincher G.B. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* 6: 724-732
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-30.
- Carpita N.C., Ralph J., McCann M.C. 2015. The Cell Wall. *In: Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed. Wiley & Sons, Hoboken, pp. 45-110.
- Cha-um S., Chanseetis C., Chitakovid W., Pichakum A., Supaibulwatana K. 2011. Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia*

- tetraphylla* L. “Keaau”) plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 435-444.
- Chen X.G., Shi C.Y., Yin Y.P., Wang Z.L., Shi Y.H., Peng D.L., Ni Y.L., Cai T. 2011. Relationship between lignin metabolism and lodging resistance in wheat. *Acta Agronomica Sinica* 37: 1616-1622.
- Cheng H., Li L., Xu F., Cheng S., Cao F., Wang Y., Yuan H., Jiang D., Wu C. 2013. Expression patterns of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene involved in lignin biosynthesis and environmental stress in *Ginkgo biloba*. *Molecular Biology Reports* 40: 707-721.
- Clausen M.H., Willats W.G.T., Knox J.P. 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research* 338: 1797-800.
- Cochrane F.C., Davin L.B., Lewis N.G. 2004. The Arabidopsis phenylalanine ammonialyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65: 1557-1564.
- Cornuault V., Buffetto F., Rydahl M.G., Marcus S.E., Torode T.A., Xue J., Crépeau M., Faria-Blanc N., Willats W.G.T., Dupree P., Ralet M., Knox J.P. 2015. Monoclonal antibodies indicate low-abundance links between heteroxylan and other glycans of plant cell walls. *Planta* 242: 1321-1334.
- Corrêa J.P.O., Vital C.E., Pinheiro M.V.M., Batista D.S., Azevedo J.F.L., Saldanha C.W., Otoni W.C. 2015. *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121: 289-300.
- Corrêa J.P.O., Vital C.E., Pinheiro M.V.M., Batista D.S., Saldanha C.W., Cruz A.C.F., Notini M.M., Freitas D.M.S., DaMatta F.M., Otoni W.C. 2016. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, *in vitro* photoautotrophic growth, and *ex vitro* biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 52: 45-55.
- Corrêa Júnior C., Ming L.C., Cortez D.A.G. 2008. Sazonalidade na produção de raízes e teor de β-ecdisona em acessos de fáfia. *Horticultura Brasileira*, 26: 393-397.
- Cosgrove D.J. 2014. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current Opinion in Plant Biology* 22: 122-131.
- Cosgrove D.J. 2018. Diffuse growth of plant cell walls. *Plant Physiology* 176: 16-27.
- Costa A.C., Rosa M., Megguer C.A., Silva F.G., Pereira F.D., Otoni W.C. 2014. A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 443-454.
- Cruz C.D. 2013. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35: 271-276.
- Cybulska J., Pieczywek P.M., Zdunek, A. 2012. The effect of Ca²⁺ and cellular structure on apple firmness and acoustic emission. *European Food Research and Technology* 235: 119-128.
- Dean G.H., Zheng H., Tewari J., Huang J., Young D.S., Hwang Y.T., Western T.L., Carpita N.C., McCann M.C., Mansfield S.D., Haughn G.W. 2007. The Arabidopsis MUM2 gene encodes a bgalactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct hydration properties. *Plant Cell* 19: 4007-4021.

- Didi V., Jackson P., Hejatko J. 2015. Hormonal regulation of secondary cell wall formation. *Journal of Experimental Botany* 66: 5015-5027.
- Do C.T., Pollet B., Thévenin J., Sibout R., Denoue D., Barrière Y., Lapiere C., Jouanin L. 2007. Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1117-1129.
- Domozych, D.S. 2012. The quest for a four-dimensional imaging in plant cell biology: it's just a matter of time. *Annals of Botany* 110: 461-474.
- Donaldson L.A., Knox J.P. 2012. Localisation of cell-wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiology* 158: 642-653.
- Dyson R.J., Band L.R., Jensen O.E. 2012. A model of crosslink kinetics in the expanding plant cell wall: yield stress and enzyme action. *Journal of Theoretical Biology* 307: 125-136.
- Festucci-Buselli R.A., Contim L.A.S., Barbosa L.C.A., Stuart J.J., Otoni W.C. 2008a. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone - a review. *Botany* 86: 978-987.
- Festucci-Buselli R.A., Contim L.A.S., Barbosa L.C.A., Stuart J.J., Vieira R.F., Otoni W.C. 2008b. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 305-311.
- Fraser C.M., Chapple C. 2011. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 9: e0152.
- Fry S.C. 2001. Plant Cell Wall Biosynthesis. *Encyclopedia of Life Sciences* 1: 2-8.
- Gao M., Showalter A.M. 2000. Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210: 865-874.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 32: 272-289.
- Geng X., Horst W.J., Golz J.F., Lee J.E., Ding Z., Yang Z.B. 2017. LEUNIG HOMOLOG transcriptional co-repressor mediates aluminium sensitivity through PECTIN METHYLESTERASE46-modulated root cell wall pectin methylesterification in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 90: 491-504.
- Harris P.J. 2005. Diversity in plant cell walls. *In: Henry R.J. (Ed.), Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants.* CABI Publishing, Wallingford. Pp. 201-227.
- Hijazi M., Velasquez S., Jamet E., Esteves J.M., Albenne C. 2014. An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model high lighting their contribution to plant cell wall architecture. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-10.
- Hu D., Liu X.B., She H.Z., Gao Z., Ruan R.W., Wu D.Q., Yi Z.L. 2017. The lignin synthesis related genes and lodging resistance of *Fagopyrum esculentum*. *Biologia Plantarum* 61: 138-146.
- Hughes J., McCully M.E. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology* 50: 1037-1041.

- Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H., Ullah I. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *In*: Leva A., Rinaldi L.M.R. (Eds.), Recent advances in plant in vitro culture, 1st ed. InTech, London, 210 p.
- Iarema L., Cruz A.C.F., Saldanha C.W., Dias L.L.C., Vieira R.F., Oliveira E.J., Otoni W.C. 2012. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110: 227-238.
- Jones L., Seymour G.B., Knox J.P. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1->4)- β -D-galactan. *Plant Physiology* 113: 1405-1412.
- Kasirajan L., Hoang N.V., Furtado A., Botha F.C., Henry R.J. 2018. Transcriptome analysis highlights key differentially expressed genes involved in cellulose and lignin biosynthesis of sugarcane genotypes varying in fiber content. *Scientific Reports* 8: 11612.
- Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D., Albersheim P. 1973. The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology* 51: 188-197.
- Kirschbaum M.U.F. 2011. Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiology* 155:117-124.
- Knox J.P. 2008. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 308-313.
- Kozai T., Kubota C. 2005. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. *In*: Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Eds.), Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Springer, Dordrecht, pp. 19-30.
- Kozai T., Niu G., Takagaki M. 2016. *Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production*. Academic Press, London, 405 pp.
- Kozai, T. 2010. Photoautotrophic micropropagation – Environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants* 10: 188-204.
- Lamport D.T.A., Várnai P. 2013. Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytologist* 197: 58-64.
- Lamport D.T.A., Várnai P., Seal C.E. 2014. Back to the future with the AGP-Ca²⁺ flux capacitor. *Annals of Botany* 114: 1069-1085
- Lee C., Teng Q., Zhong R., Ye Z.H. 2011. Molecular dissection of xylan biosynthesis during wood formation in poplar. *Molecular Plant* 4: 730-747.
- Lee K.J.D., Marcus S.E., Knox J.P. 2011. Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Molecular Plant* 4: 212-219.
- Leszczuk A., Szczuka E., Wydrych J., Zdunek, A. 2018. Changes in arabinogalactan proteins (AGPs) distribution in apple (*Malus x domestica*) fruit during senescence. *Postharvest Biology and Technology* 138: 99-106.
- Liu J.X., Feng K., Wang G.L., Xu Z.S., Wang F., Xiong A.S. 2018. Elevated CO₂ induces alteration in lignin accumulation in celery (*Apium graveolens* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 127: 310-319.

- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25:402-408.
- Liwanag A.J.M., Ebert B., Verhertbruggen Y., Rennie E.A., Rautengarten C., Oikawa A., Andersen M.C.F., Clausen M.H., Scheller H.V. 2012. Pectin biosynthesis: GAL51 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-galactan β -1,4-galactosyltransferase. *Plant Cell* 24: 5024-5036.
- Long S.P., Ainsworth E.A., Rogers A., Ort D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants face the future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591-628.
- Ma Q.H. 2009. The expression of caffeic acid 3-O-methyltransferase in two wheat genotypes differing in lodging resistance. *Journal of Experimental Botany* 60: 2763-2771.
- Maciel M.A.M., Pinto A.C., Veiga-Jr V.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A. 2002. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 429-438.
- McCann M.C., Roberts K. 1994. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* 45: 1683-1691.
- McCartney L., Marcus S.E., Knox J.P. 2005. Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 53: 543-546.
- McCartney L., Ormerod A.P., Gidley M.J., Knox J.P. 2000. Temporal and spatial regulation of pectic (1 \rightarrow 4)-b-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant Journal* 22: 105-113.
- Morris G.A., Foster T.J., Harding S.E. 2000. The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloid* 14: 227-235.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Oliveira V.F., Zaidan L.B.P., Braga M.R., Aidar M.P.M., Carvalho, M.A.M. 2010. Elevated CO₂ atmosphere promotes plant growth and inulin production in the cerrado species *Vernonia herbacea*. *Functional Plant Biology* 37: 223-231.
- Orfila C., Knox J.P. 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiology* 122: 775-781.
- Peaucelle A., Braybrook S.A., Le Guillou L., Bron E., Kuhlemeier C., Hofte H. 2011. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* 21: 1720-1726.
- Peaucelle A., Wightman R., Hofte H. 2015. The Control of Growth Symmetry Breaking in the *Arabidopsis* Hypocotyl. *Current Biology* 25: 1746-1752.
- Peng D.L., Chen X.G., Yin Y.P., Lu K.L., Yang W.B., Tang Y.H., Wang Z.L. 2014. Lodging resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.): lignin accumulation and its related enzymes activities due to the application of paclobutrazol or gibberellin acid. *Field Crops Research* 157: 1-7.
- Pérez-Jiménez M., López-Pérez A.J., Otálora-Alcón G., Marín-Nicolás D., Piñero M.C., del Amor F.M. 2015. A regime of high CO₂ concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121: 547-557.

- Pérez-Jiménez M., Bayo-Canha A., Lopez-Ortega G., del Amor F.M. 2017. Growth, Plant Quality, and Survival of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Seedlings are Enhanced by CO₂ Enrichment. *HortScience* 52: 1650-1654.
- Pilarska M., Knox J.P., Konieczny R. 2015. Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 115: 35-44.
- Ponniah S.K., Shang Z., Akbudak M.A., Srivastava V., Manoharan M. 2017. Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase, cinnamoyl CoA reductase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase leads to lignin reduction in rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare). *Plant Biotechnology Reports* 11: 17-27.
- Potocka I., Baldwin T.C., Kurczynska E.U. 2012. Distribution of lipid transfer protein 1 (LTP1) epitopes associated with morphogenic events during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 31: 2031-2045.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3: 29-60.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
- Robredo A., Pérez-López U., de la Maza H.S., González-Moro B., Lacuesta M., Mena-Petite A., Muñoz-Rueda A. 2007. Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany* 59: 252-263.
- Saldanha C.W., Otoni C.G., Azevedo J.L.F., Dias L.L.C., Rêgo M.M., Otoni W.C. 2012. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110: 413-422.
- Saldanha C.W., Otoni C.G., Rocha D.I., Cavatte P.C., Detmann K.S.C., Tanaka F.A.O., Dias L.L.C., DaMatta F.M., Otoni W.C. 2014. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of in vitro Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 87-99.
- Saldanha C.W., Otoni C.G., Notini M.M., Kuki K.N., Cruz A.C.F., Neto A.R., Dias L.L.C., Otoni W.C. 2013. A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 49: 433-444.
- Sanches R.F.E., Catarino I.C.A., Braga M.R., Silva E.A. 2017. Influência da alta concentração atmosférica de CO₂ ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$) \times disponibilidade hídrica nas relações hídricas, trocas gasosas e acúmulo de carboidratos em *Coffea arabica* L. *Hoehnea* 44: 635-643.
- Santos D.T., Albarellib J.Q., Meireles M.A.A. 2012. Simulation of an integrated sustainable production of extract from Brazilian ginseng roots with a cogeneration plant. *Chemical Engineering Transactions* 29: 91-96.
- Scheller H.V., Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61: 263-289.

- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.
- Scully E.D., Gries T., Funnell-Harris D.L., Xin Z., Kovacs F.A., Vermerris W., Sattler S.E. 2015. Characterization of novel Brown midrib 6 mutations affecting lignin biosynthesis in sorghum. *Journal of Integrative Plant Biology* 58: 136-149.
- Seifert G.J., Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58: 137-161.
- Shi Y., Jiang L., Zhang L., Kang R., Yu Z. 2014. Dynamic changes in proteins during apple (*Malus x domestica*) fruit ripening and storage. *Horticulture Research* 1: 1-21.
- Shinohara N., Kakegawa K., Fukuda H. 2015. Monoclonal antibody-based analysis of cell wall remodeling during xylogenesis. *Journal of Plant Research* 128: 975-986.
- Singh A., Agrawal M. 2015. Effects of ambient and elevated CO₂ on growth, chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, antioxidants, and secondary metabolites of *Catharanthus roseus* (L.) G Don. grown under three different soil N levels. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 3936-3946.
- Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredez A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206–2221.
- Souza A. P., Gaspar M., Silva E. A., Ulian E. C., Waclawovsky A. J., Nishiyama Jr. M. Y., Santos R. V., Teixeira M. M., Souza G. M., Buckeridge M. S. 2008. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell and Environment* 31: 1116–1127.
- Sykes R.W., Gjersing E.L., Foutz K., Rottmann W.H., Kuhn S.A., Foster C.E., Ziebell A., Turner G.B., Decker S.R., Hinchey M.A.W., Davis M.F. 2015. Down-regulation of p-coumaroyl quinate/shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes in the lignin biosynthetic pathway of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* leads to improved sugar release. *Biotechnology for Biofuels* 8: 128.
- Tan L., Eberhard S., Pattathil S., Warder C., Glushka J., Yuan C., Hao Z., Zhu X., Avci U., Miller J.S., Baldwin D., Pham C., Orlando R., Darvill A., Hahn M.G., Kieliszewski M.J., Mohnen D. 2013. An Arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *The Plant Cell* 25: 270-287.
- Tan D., Sun X., Zhang, J. 2011. Histochemical and immunohistochemical identification of laticifer cells in callus cultures derived from anthers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Reports* 30: 1117-1124.
- Tu Y., Rochfort S., Liu Z., Ran Y., Griffith M., Badenhorst P., Louie G.V., Bowman M.E., Smith K.F., Noel J.P., Mouradov A., Spangenberg G. 2010. Functional Analyses of Caffeic Acid O-Methyltransferase and Cinnamoyl-CoA-Reductase Genes from Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant Cell* 22: 3357-3373.
- Ulvskov P., Wium H., Bruce D., Jørgensen B., Qvist K.B., Skjøt M., Hepworth D., Borkhardt B., Sørensen S.O. 2005. Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I in tubers of transgenic potatoes. *Planta* 220: 609-620.

- Van Cutsem P., Messiaen J. 1994. Biological effects of pectic fragments in plant cells. *Acta Botanica Neerlandica* 43: 231-245.
- Vanholme R., Morreel K., Darrah C., Oyarce P., Grabber J.H., Ralph J., Boerjan W. 2012. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytologist* 196: 978-1000.
- Voxeur A., Höfte H. 2016. Cell wall integrity signaling in plants: “To grow or not to grow that’s the question.” *Glycobiology* 26: 950-960.
- Weng J.K., Chapple C. 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist* 187: 273-285.
- Willats W.G., McCartney L., Mackie W., Knox J.P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.
- Xiao Y., Niu G., Kozai T. 2011. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105:149–158.
- Yang W., Schuster C., Beahan C.T., Charoensawan V., Peaucelle A., Bacic A., Doblin M.S., Wightman R., Meyerowitz E.M. 2016. Regulation of meristem morphogenesis by cell wall synthases in Arabidopsis. *Current Biology*, 26:1404–1415.
- Yates EA, Valdor J-F, Haslam SM, et al. 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6: 131–139.
- Yoo J.H., Seong E.S., Ghimire B.K., Heo K., Jin X., Yamada T., Clark L.V., Sacks E.J., Yu C.Y. 2018. Establishment of *Miscanthus sinensis* with decreased lignin biosynthesis by *Agrobacterium*-mediated transformation using antisense COMT gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133: 359-369.
- Zhang X., Liu C.J. 2015. Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. *Molecular Plant* 8: 17-27.
- Zykwinska A., Gaillard C., Bule´on A., Pontoire B., Garnier C., Thibault J.F., Ralet M.C. 2007. Assessment of *in vitro* binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and X-ray diffraction methods. *Biomacromolecules* 8: 23