

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RENAN FALCIONI

Luz e giberelinas induzem respostas estruturais da planta em nível celular e, independentemente, estimulam a deposição de lignina nas paredes das fibras do xilema

Maringá

2017

RENAN FALCIONI

Luz e giberelinas induzem respostas estruturais da planta em nível celular e, independentemente, estimulam a deposição de lignina nas paredes das fibras do xilema

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Werner Camargos Antunes

Maringá

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

F178L Falcioni, Renan  
Luz e giberelinas induzem respostas estruturais da planta em nível celular e, independentemente, estimulam a deposição de lignina nas paredes das fibras do xilema / Renan Falcioni. -- Maringá, 2017. xiii, 75 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Werner Camargos Antunes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017

1. Anatomia vegetal. 2. Plantas - Parede celular. 3. Nicotiana tabacum. 4. Lignificação. I. Antunes, Werner Camargos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 23.ed. 631.8

GVS-003718

# FOLHA DE APROVAÇÃO

RENAN FALCIONI

Luz e giberelinas induzem respostas estruturais da planta em nível celular e, independentemente, estimulam a deposição de lignina nas paredes das fibras do xilema

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Werner Camargos Antunes  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr<sup>a</sup> Érika Amano  
Universidade Federal do Paraná

Aprovado em:

Local da defesa: Anfiteatro da Pós-Graduação em Agronomia, Bloco J-45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá aos 23 dias de fevereiro de 2017.

# DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus  
pais*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço:*

À Deus pela Força e Bênção a Minha Vida

Aos meus pais, Sidnei Falcioni e Rosangela Maria Batista Falcioni, pelo amor e carinho, conselhos e ensinamentos, apoio e educação proporcionados.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e a CAPES pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Werner Camargos Antunes, pela oportunidade em conhecer a Fisiologia Vegetal, orientação, amizade, ensinamentos, empenho e apoio na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Antônio de Souza, pelo apoio no Laboratório de Histotécnica Vegetal, para realização das avaliações anatômicas. Às companheiras Luciane, Amanda, Fabiana e Danielly pelas boas conversas.

À professora Dr<sup>a</sup> Evanilde Benedito do Laboratório de Ecologia Energética pela valiosa parceria para realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Moacir Bonato pelos conselhos e estrutura fornecida para realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Rubem Silvério de Oliveira Junior pelo espaço concedido na casa de vegetação do NAPD.

Ao professor Dr. Wanderley Dantas dos Santos por abrir as portas do Bioplan e pela parceria realizada para desenvolvimento desse trabalho, e ao amigo Dyoni Matias de Oliveira no suporte com as análises para quantificação de lignina.

À Central de Microscopia do COMCAP (UEM) em especial às meninas Andressa, Greice, Rosimar e Suzana pelas ótimas conversas e trocas de experiências.

Ao LMEM de Londrina em especial ao Téc. Osvaldo e ao Prof. Admilton.

Aos técnicos de laboratório e servidores da UEM, Nelson Kukubo, Sr. Júlio, Sr. Milton e Érika pelo excelente trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal.

Aos Departamentos vinculados e a todos os Professores e Colegas, que de alguma forma participaram e contribuíram nessa etapa da minha vida.

**OBRIGADO!!!**

## SUMÁRIO

### Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Material vegetal e condições de crescimento.....	11
3.2. Delineamento experimental e montagem dos experimentos.....	11
3.3. Análise de crescimento.....	12
3.4. Determinação da interceptação de luz.....	13
3.5. Determinação dos teores de pigmentos foliares.....	13
3.6. Determinação dos dados de reflectância, absorvância e transmitância da luz.....	13
3.7. Análises anatômicas.....	14
3.7.1. Microscopia de luz.....	14
3.7.2. Microscopia de fluorescência.....	14
3.7.2.1. Análise com material incluído em PEG.....	14
3.7.2.2. Análise da fluorescência da parede celular de caule infiltrados em historesina.....	15
3.7.3. Maceração.....	15
3.7.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	16
3.8. Análise calorimétrica.....	16
3.9. Quantificação dos teores de lignina.....	17
3.10. Análises estatísticas.....	17
3.11. Análise multivariada.....	18
4. RESULTADOS .....	19
4.1. Análises fisiológicas e parâmetros de crescimento.....	19
4.2. Análises dos pigmentos.....	28
4.3. Espectro de absorvância da folha e pigmentos.....	30
4.4. Análises anatômicas.....	33
4.4.1. Microscopia de luz da folha.....	34
4.4.2. Microscopia de luz do caule.....	37
4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	44
4.5. Análise calorimétrica.....	47
4.6. Quantificação de lignina.....	49
4.7. Análise multivariada.....	50
5. DISCUSSÃO.....	56
5.1. Efeito das giberelinas sobre o crescimento e interceptação da luz.....	56

5.2. Efeito das giberelinas e da luz sobre a lignificação.....	59
5.3. Efeito das giberelinas e da luz sobre a atividade mitótica das FX .....	62
6. CONCLUSÕES .....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Imagem representativa de plantas de tabaco cultivadas em ambientes de alta ( $A_{IR}$  – 100% de luz) e baixa ( $B_{IR}$  – 8,5% de luz) irradiâncias com diferentes concentrações de Ácido Giberélico ( $GA_3$ ) e Paclobutrazol (PBZ). Da esquerda para a direita, os fenótipos de plantas de  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$  (intercalados) e os tratamentos Controle (Cont),  $GA_3$  10  $\mu M$  (GA10),  $GA_3$  100  $\mu M$  (GA100), Paclobutrazol 50  $mg L^{-1}$  (PBZ),  $GA_3$  10  $\mu M$  + PBZ (GA10P) e  $GA_3$  100  $\mu M$  + PBZ (GA100P), respectivamente. ....19
- Figura 2** – Acúmulo de matéria seca (MS) total da planta (A); da folha (B); do caule (C); da raiz (D) e da área foliar total (E), em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações (Cont, GA10, GA100, PBZ, GA10P e GA100P, para mais detalhes das siglas veja na Figura 1) e em sol e sombra nas seguintes irradiâncias (100 e 8,5%, respectivamente) ao 10º e 20º dias após imposição dos tratamentos. Médias seguidas de letras maiúsculas ou minúsculas distintas representam diferenças estatísticas pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) na mesma irradiância e entre diferentes níveis de giberelinas (GAs). Asteriscos sobre as médias representam diferenças estatísticas pelo teste  $t$  de Student ( $p \leq 0,05$ ) entre distintas irradiâncias no mesmo nível de GAs.  $n=6 \pm SE$ . ....20
- Figura 3** – Parâmetros de crescimento: altura total da planta (A); comprimento do caule (B); dos entrenós (C); diâmetro do caule (D) e da raiz (E), em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$ . Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2.  $n=6 \pm SE$ . ....23
- Figura 4** – Razões de área foliar total da planta (A); massa foliar (B); massa caulinar (C); massa radicular (D) e área foliar específica (E), em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$ . Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2.  $n=6 \pm SE$ . ....26
- Figura 5** – Taxa de crescimento relativo (TCR) total da planta (A); crescimento absoluto (TCA) caulinar (B); crescimento relativo caulinar (C) e taxa assimilatória líquida em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$ . Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2.  $n=6$ . ....27
- Figura 6** – Volume do cone (A) e densidade de área foliar (DAF) (B) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$ . Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2.  $n=6 \pm SE$ . ....28
- Figura 7** – Pigmentos foliares: clorofila a, b, totais (a+b) e carotenoides (carotenos e xantofilas) expressos por unidade de área em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de sol (A) e sombreado (B) ao 10º e 20º dias após aplicação dos tratamentos. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2.  $n=6 \pm SE$ . ....28

**Figura 8** – Pigmentos foliares: clorofila a, b, totais (a+b) e carotenoides (carotenos e xantofilas) expressos por unidade de massa em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de sol (A) e sombreado (B) ao 10° e 20° dias após aplicação dos tratamentos. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.....29

**Figura 9** – Curva do espectro de absorvância da folha (in vivo) e dos pigmentos (in vitro) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de sol (A) e sombra (B). Siglas conforme Figura 2. n=6. ....30

**Figura 10**– Correlação linear entre absorvância da folha (in vivo) com a e absorvância dos pigmentos extraídos em acetona (in vitro; sem distinção) nos comprimentos de onda do azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. \* indica correlação significativa (p≤0,05) pelo teste F. Mais detalhes das siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=36. ....32

**Figura 11** – Correlação linear entre absorvância da folha (in vivo) com a e absorvância dos pigmentos extraídos em acetona (in vitro; com distinção entre os pigmentos; (A-C) Clorofila a, (D-F) Clorofila b, (G-I) Clorofila a+b, (J-L) Carotenoides totais) nos comprimentos de onda do azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações no ambiente de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. \* indica correlação significativa (p≤0,05) pelo teste F. Mais detalhes das siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=36. ....33

**Figura 12**– Espessura da folha de plantas de tabaco em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=20±SE. ....34

**Figura 13** – Microscopia de luz da secção transversal de folhas de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: (A) Cont; (B) GA10; (C) GA100; (D) PBZ; (E) GA10P e (F) GA100P aos 20 dias. Siglas conforme Figura 2. Barra = 50µm. ....35

**Figura 14** – Microscopia de luz da secção transversal de folhas de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: (A) Cont; (B) GA10; (C) GA100; (D) PBZ; (E) GA10P e (F) GA100P aos 20 dias. Siglas conforme Figura 2. Barra = 50µm. ....36

**Figura 15** – Frequência de vasos (A); frequência de fibras do xilema (B); comprimento das fibras do xilema (C); largura do xilema secundário (D) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE. ....37

**Figura 16** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em PEG, corado com azul de astra e safranina e analisado em  $\lambda$ 460nm Barra = 100 $\mu$ m ou 50  $\mu$ m (box). Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Ra = Raios do xilema.....38

**Figura 17** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em historesina, corados com Calcofluor White 28 (0,01%) e Auramina O (0,01%) e analisado em  $\lambda$ 360nm. Barra = 500 $\mu$ m. Zc = Zona cambial; Par = Células parenquimáticas.....39

**Figura 18** – Microscopia de luz das fibras maceradas de caules de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Corados com safranina 1%. Barra = 500 $\mu$ m. Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Par = Células parenquimáticas.....40

**Figura 19** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em PEG, corado com azul de astra e safranina e analisado em  $\lambda$ 460nm Barra = 100 $\mu$ m ou 50  $\mu$ m (box). Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Ra = Raios do xilema.....41

**Figura 20** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em historesina, corados com Calcofluor White 28 (0,01%) e Auramina O (0,01%) e analisado em  $\lambda$ 360nm. Barra = 100 $\mu$ m. Zc = Zona cambial; Par = Células parenquimáticas.....42

**Figura 21** – Microscopia de luz das fibras maceradas de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Corados com safranina 1%. Barra = 500 $\mu$ m. Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Par = Células parenquimáticas.....43

**Figura 22** – Microscopia eletrônica de varredura de caules de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Barra = 500 $\mu$ m e 20  $\mu$ m (box). Setas apontam para o detalhe da espessura da parede das fibras do xilema.....45

**Figura 23** – Microscopia eletrônica de varredura de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Barra = 100µm e 20 µm (box). Setas apontam para o detalhe da espessura da parede das fibras do xilema.....46

**Figura 24** – Conteúdo energético da raiz, caule e folhas de plantas de tabaco submetidas à aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (para mais detalhes das siglas veja na Figura 2). Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE. ....47

**Figura 25** – Energia acumulada da raiz, caule e folha (A); energia acumulada total (B) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE. ....48

**Figura 26** – Teores de lignina do caule em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.....50

**Figura 27** – Distribuição espacial dos escores estimados de cada repetição e tratamento em relação ao componente principal 1 (PCA1) e ao componente principal 2 (PCA2) e seus respectivos percentuais da variância total explicadas por cada um dos componentes em relação ao acúmulo de lignina. Sugestivamente atribui-se aos quadrantes uma forte aderência dos tratamentos com níveis de luz\* e com os níveis de GAs\*\*. Siglas conforme Figura 1. ....51

**Figura 28** – Escores estimados dos tratamentos em relação aos componentes principais (PCA1 e PCA2). Médias seguidas de letras maiúsculas ou minúsculas distintas representam diferenças estatísticas pelo teste de Duncan (p≤0,05) na mesma irradiância e entre diferentes níveis de GA<sub>3</sub>. \*\*\*Asteriscos sobre as médias representam diferenças estatísticas pelo teste t de Student (p≤0,001) entre distintas irradiância no mesmo nível de GA<sub>3</sub>. Demais siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.....52

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Absorbância da folha dos comprimentos de onda no azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (para mais detalhes das siglas veja na Figura 2). Dados em negrito indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste t de Student entre plantas de sol e sombra. Mais detalhes das siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.....31

**Tabela 2** – Porcentagem de explicação do acúmulo de lignina (lignina extraída) ou da variância total por diferentes grupos de dados experimentais pelos PCA1 e PCA2 estimados via análise de componentes principais. ....54

**Tabela 3** – Autovetores estimados para PCA1 e PCA2 das diferentes variáveis avaliadas experimentalmente de plantas de tabaco em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub> (Cont, GA10, GA100, PBZ, GA10P e GA100P) em A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (100 e 8,5% de irradiância). .....54

## LISTA DE ABREVIACOES

- AFE – rea foliar específica
- A<sub>IR</sub> – Ambiente de alta irradiância (100% da luz natural)
- B<sub>IR</sub> – Ambiente de baixa irradiância (8,5% da luz natural)
- C – Carbono
- CAD – Cinamil lcool desidrogenase
- Car<sub>(car+xant)</sub> – Carotenóides (carotenos e xantofilas)
- Chl<sub>(a/b)</sub> – Razão clorofila *a/b*
- Chl<sub>(a+b)</sub> – Clorofilas totais (*a+b*)
- Chl<sub>a</sub> – Clorofila *a*
- Chl<sub>b</sub> – Clorofila *b*
- Cont – Controle
- Cv – Câmbio vascular
- Ev – Elemento de vaso do xilema
- FX – Fibras do xilema
- GA10 – Concentraqo de ácido giberélico 10μM
- GA100 – Concentraqo de ácido giberélico 100μM
- GA100P – Aplicaqo conjunta de ácido giberélico 100μM e paclobutrazol 50mg L<sup>-1</sup>
- GA10P – Aplicaqo conjunta de ácido giberélico 10μM e paclobutrazol 50mg L<sup>-1</sup>
- GA20ox – GA20-oxidase
- GA2ox – GA2-oxidase
- GA<sub>3</sub> – cido giberélico
- GA3ox – GA3-oxidase
- GAs - Giberelinas
- GID1 – GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1
- IAF – ndice de área foliar
- ICA – INCREASED CAMBIAL ACTIVITY
- KAO – *ent*-kaurenoico oxidase
- KO – *ent*-kaureno oxidase
- KS – *ent*-kaureno sintase
- PAL – Fenilalanina amônia-liase
- Par – Células parenquimáticas
- PBZ – Paclobutrazol

PCA – Análise de componentes principais  
PCIP – Parede celular isenta de proteína  
PEG 6000 – Polietilenoglicol 6000  
PIF – Fator de Interação dos Fitocromos  
Ra – Células do raio do xilema secundário  
RAF – Razão de área foliar  
RMC – Razão de massa caulinar  
RMR – Razão de massa radicular  
SOD – Superóxido dismutase  
TAL – Taxa assimilatória líquida  
TCA – Taxa de crescimento absoluto  
TCR – Taxa de crescimento relativo  
XET – Xiloglucano endotransglicosilase  
XTHs – Xiloglucanos endotransglucosilase/hidrolase  
Zc – Zona cambial

Luz e giberelinas induzem respostas estruturais da planta em nível celular e, independentemente, estimulam a deposição de lignina nas paredes das fibras do xilema

## RESUMO

As plantas estão constantemente submetidas às variações de luz no ambiente e os hormônios vegetais são uma das formas de intermediação entre o sinal ambiental e a resposta fisiológica. Dentre eles, as giberelinas (GAs) promovem alterações fisiológicas que regulam os padrões de crescimento e desenvolvimento vegetal. Alterações morfológicas como comprimento dos entrenós e espessura das folhas são respostas bem conhecidas desse hormônio. A manipulação conjunta dos níveis de luz e níveis endógenos de GAs pode influenciar o acúmulo de biomassa da planta ou a sua morfologia em um complexo envolvendo *crossstalk* em resposta à disponibilidade de luz e GAs. Desse modo testamos a hipótese que luz e as GAs atuariam independentemente em algumas modificações especialmente das fibras do xilema, acúmulo de lignina e demais alterações morfo-anatômicas. Para tanto foram cultivadas plantas de tabaco em ambientes de alta e baixa irradiância com diferentes concentrações de Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) e Paclobutrazol (PBZ, inibidor da biossíntese de GAs) em esquema fatorial. Avaliou-se o ganho de biomassa, interceptação da luz, absorvância da folha e teores de pigmentos, alterações morfo-anatômicas das folhas e do caule e quantificação dos teores de lignina no caule. Os resultados fornecem suporte para a hipótese que GAs são capazes de promover alterações fenotípicas em ambientes de alta e de baixa irradiância desencadeando respostas diferentes ao ganho de biomassa, captura de luz, eficiência energética, estruturas anatômicas e lignificação das plantas de tabaco. Conclui-se que luz e GAs atuam de modo aditivo na indução da lignificação e estímulo à diferenciação de fibras. Além disso, tanto as GAs quanto a luz estimulam independentemente a rota dos fenilpropanóides que, em última instância, encontra-se intimamente relacionado a lignificação e espessamento das fibras do xilema. Ainda, as GAs são capazes de restaurar apenas parcialmente as alterações anatômicas no xilema das plantas submetidas ao cultivo sombreado indicando a influência da luz nesses processos.

**Palavras-chave:** Anatomia, parede celular, *Nicotiana tabacum*, lignificação.



# Light and gibberellins induces plant cell structural changes and independently activates lignin deposition in xylem fibers

## ABSTRACT

Plants are constantly subjected to light variations in the environment and plant hormones interplay between the environmental signal and the physiological response. Among them, the gibberellins (GAs) promote physiological changes that regulates plant growth and development. Morphological changes such as internodes length and leaf thickness are well-known responses of this hormone. The combined manipulation of light levels and endogenous levels of GAs may influence plant biomass accumulation or its morphology in a complex response involving crosstalk between light and GAs availabilities. In this way, we test the hypothesis that light and GAs would act independently on those changes, especially stimulating fibers of the xylem vascular bundle lignification, and other morpho-anatomical alterations. For this goal, wild-type tobacco plants were cultivated in high and low irradiance environments with different concentrations of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) and Paclobutrazol (PBZ, an GAs biosynthesis inhibitor) in a factorial scheme. Biomass gain, plant light interception, leaf-level light absorbance and pigment contents, morpho-anatomical changes of the leaves and stem; and quantification of lignin contents in the stem were evaluated. Our results support the hypothesis that GAs are capable of promoting phenotypic changes in high and low irradiance environments, triggering different responses to biomass gain, light capture, energy efficiency, anatomical structures and lignification of tobacco plants. We concluded that light and GAs act in an additive way for the induction of lignification and stimulation the differentiation of interfascicular fibers. In addition, both GAs and light independently of each other stimulate phenylpropanoids pathway, which ultimately is closely related to the lignification and thickening of xylem fibers. Moreover, the GAs are able to partially restore only the anatomical changes in the vascular bundle of the plants submitted to the shaded environment indicating the unique light response to those process.

**Keywords:** Plant anatomy, cell wall, *Nicotiana tabacum*, lignification.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente submetidas às variações de luz, de água, nutrientes, temperatura e, entre outros fatores que caracterizam a heterogeneidade espacial e temporal do ambiente. Nessa perspectiva, a luz talvez seja um dos componentes ambientais que mais afeta a dinâmica de vida das plantas. Variações da intensidade luminosa do ambiente induzem alterações fisiológicas tanto em nível fotossintético quanto ao nível da regulação do desenvolvimento vegetal (WADA; SHIMAZAKI; IINO, 2005; PUGNAIRE; VALLADARES, 2007; KUREPIN; PHARIS, 2014). As variações no desenvolvimento são associadas às complexas vias de percepção, sinalizações hormonais, regulação do padrão de expressão dos genes e alterações celulares que resultam em modificações do metabolismo, da estrutura e da arquitetura celular e, por fim, da planta, de modo a regular intrinsecamente o crescimento e desenvolvimento das plantas com o ambiente ao seu redor (NIINEMETS, 2007; ALABADÍ et al., 2008; KUREPIN; PHARIS, 2014). Dentre os vários hormônios vegetais sintetizados pelas plantas, as giberelinas (GAs) pertencem a um grupo de diterpenóides tetracíclicos que promovem alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas nas plantas (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2012; HEDDEN; THOMAS, 2016). GAs atuam em várias etapas dos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo aspectos como indução da germinação de sementes, indução do alongamento do caule, estímulo à expansão foliar e indução do florescimento em algumas espécies de plantas (KUREPIN et al., 2006; YAMAGUCHI, 2008; HEDDEN; THOMAS, 2016).

Uma resposta pouco explorada das GAs nas plantas aponta que elas atuam no controle da indução e diferenciação de fibras e na deposição de lignina nas células das fibras do xilema secundário (FX) (DAYAN et al., 2010; YANG et al., 2015). Trabalhos realizados com aplicação exógena de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e/ou inibidores de sua biossíntese (RIBEIRO et al., 2012; GUO et al., 2015) ou ainda com o uso de plantas transgênicas com superexpressão de genes regulatórios na biossíntese de GAs, bem como na sua degradação, ou seja, plantas que resultam no aumento ou redução nos níveis endógenos desse hormônio, (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2010) tem-se relacionado às alterações do metabolismo, crescimento e desenvolvimento secundário do caule assim como das modificações da arquitetura da parede celular (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2010; DIXIT, 2013; GUO et al., 2015; VOOREND et

al., 2016). As ligninas são depositadas nas paredes celulares, conferindo resistência e impermeabilidade das estruturas exteriores das células vegetais (FERREIRA et al., 2017). Além disso, elas são importantes no suporte da planta e estão em grande parte presentes nas esclereides, fibras e elementos traqueais do xilema (FERREIRA et al., 2017). Ainda, recentemente mostrado por FERREIRA et al. (2017), plantas de tabaco possuem diferentes tipos de lignina nas células do caule, sendo distintas as variações presentes nas fibras daquelas depositadas nos elementos traqueais.

Alterações da luminosidade no habitat das plantas estão associadas a alto grau de plasticidade fenotípica e tem influência sobre os níveis endógenos de GAs ou sobre a cascata de sinalização desencadeada por esse hormônio (LAU; DENG, 2010; KUREPIN; PHARIS, 2014; HEDDEN; THOMAS, 2016). Plantas crescidas em ambientes de alta irradiância apresentam estímulo ao crescimento das raízes, redução do comprimento do caule e entrenós mais curtos, maior razão de área foliar além de outras alterações morfológicas como redução da dominância apical (GIVNISH, 1988; LAU; DENG, 2010; KUREPIN; PHARIS, 2014). Envolvem ainda maior concentração de clorofilas e carotenoides por unidade de área foliar, folhas mais espessas, células do parênquima paliçádico mais alongadas, maior lignificação dos tecidos, dentre outras alterações bioquímicas e anatômicas que propiciam aclimação em alta irradiância (GIVNISH, 1988; PUGNAIRE; VALLADARES, 2007; KUREPIN; PHARIS, 2014). Por outro lado, plantas cultivadas em baixa irradiância apresentam características de estiolamento, aumento do comprimento dos entrenós, maior razão de massa caulinar e menor concentração de lignina por unidade de biomassa. As folhas geralmente são mais finas, cloroplastos com maior concentração de clorofila e menor de carotenoides, células com parede celulares mais finas e menor adensamento dos tilacoides (HOFFMANN; POORTER, 2002; KUREPIN et al., 2007; PUGNAIRE; VALLADARES, 2007; LAU; DENG, 2010; KUREPIN; PHARIS, 2014; HEDDEN; SPONSEL, 2015). Tipicamente algumas dessas modificações morfo-fisiológicas estão interligadas às variações ambientais como a luz, que podem ser desencadeadas via *downstream* por alterações na rota de sinalização das GAs ou ainda um *crossstalk* entre via de sinalização das GAs com sinalização desencadeada pelos fotorreceptores (ALABADÍ et al., 2008; LAU; DENG, 2010; HEDDEN; THOMAS, 2016). Salienta-se que não é excludente a participação de outros hormônios em algumas dessas respostas envolvendo variações na intensidade de luz (ALABADÍ et al., 2008; LAU; DENG, 2010). Em condições de sombreamento os teores de GAs são maiores nas plantas (KUREPIN et al., 2006; KUREPIN; PHARIS, 2014) e, por sua vez desencadeia o alongamento celular e

características estioladas das plantas. Ainda, há uma menor deposição de lignina nas células de fibras do xilema secundário (FX) na condição de estiolamento. A lignificação tende a ser proporcional a quantidade de luz incidente, ou seja, quanto menos luz, maiores os teores GAs e menores os de lignina (e vice-versa). No entanto, vários trabalhos mostram que o aumento nos teores de GAs estimulam a deposição de lignina em condições de plena irradiância (WADA; SHIMAZAKI; IINO, 2005; KUREPIN et al., 2006; MOURA et al., 2010; YANG et al., 2015; HEDDEN; THOMAS, 2016). Desse modo há lacunas no nosso conhecimento sobre o provável *crosstalk* entre os efeitos da luz com os das GAs sobre o metabolismo da lignina. Pouco se conhece sobre a interação entre níveis de GAs e disponibilidade de luz na diferenciação de fibras do xilema e a suas respostas individuais sobre a deposição de lignina na parede celular (DAYAN et al., 2012), em especial para ambientes de baixa irradiância.

Aplicações de Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) e/ou o inibidor da biossíntese de GAs, o paclobutrazol (PBZ); um inibidor da enzima *ent*-kaureno oxidase, (KO; EC 1.14.13.78), permitem alterar o metabolismo de GAs nas plantas (HEDDEN; THOMAS, 2016). Aplicação de PBZ tem fornecido bons *insights* para análises de estruturas em níveis morfológico, anatômicos e metabólicos (RIBEIRO et al., 2012; GUO et al., 2015). Plantas tratadas com PBZ apresentam menores teores de GAs e com fenótipo anão, induzido por meio da redução do comprimento do caule, dos entrenós e perda da dominância apical (DAVIES, 2010; HEDDEN; THOMAS, 2016). Concomitante a isso, o PBZ (e moléculas relacionadas como Uniconazol ou Ancymidol) (TOKUNAGA; UCHIMURA; SATO, 2006) permite realizar estudos ecofisiológicos em plantas selvagens de modo a evitar efeitos pleiotrópicos da manipulação da expressão em plantas transgênicas com alterações no metabolismo de GAs, frequentemente usando-se os genes da GA2-oxidase ou GA20-oxidase (RIBEIRO et al., 2012; GUO et al., 2015; HEDDEN; THOMAS, 2016). Nesse sentido, optou-se pela aplicação foliar de GA<sub>3</sub> e uso de PBZ no solo na investigação os aspectos ecofisiológicos e anatômicos em plantas de tabaco sobre a influência de diferentes níveis de GA em ambientes de alta e baixa irradiâncias. Testou-se a hipótese que a luz e as GAs atuariam independentemente na promoção de modificações estruturais do xilema (KUREPIN et al., 2007; HEDDEN; THOMAS, 2016) e acúmulo de lignina no caule (ERIKSSON et al., 2000; DAYAN et al., 2012; GUO et al., 2015) e outras alterações morfológicas (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; GUO et al., 2015) e anatômicas nas plantas (DAYAN et al., 2010; VOOREND et al., 2016).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde os estudos clássicos e publicados a partir do final do século XIX os pesquisadores têm demonstrado que os vegetais percebem muitos sinais ambientais, a fim de realizarem o ajuste preciso do seu crescimento e do desenvolvimento. A luz é um importante sinal ambiental e um dos mais relevantes na regulação dos processos que moldam o desenvolvimento das plantas. Por meio da percepção de múltiplos parâmetros da luz (quantidade, qualidade, direção e fotoperíodo), as plantas adquirem informação ambiental ao seu redor e ajustam seu crescimento e desenvolvimento de modo a maximizar as chances de sobrevivência e propagação. Muitos dos principais eventos do desenvolvimento em um ciclo de vida vegetal (como germinação, fotomorfogênese, diferenciação celular e lignificação de tecidos) são regulados por sinais ambientais (luz, temperatura, nutrientes) e endógenos (hormônios e outras moléculas sinalizadoras) (SRIVASTAVA, 2002; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015) no qual resultam em alterações morfológicas na planta.

A demonstração das alterações do crescimento e no desenvolvimento vegetal podem ser quantificados e demonstrados por meio de análise de crescimento. Ela se baseia na avaliação de componentes básicos da planta como matéria seca e comprimento de raiz, caule e folhas e área foliar. Ainda, completa-se por parâmetros derivados como área foliar específica (AFE), razões de massa radicular (RMR), caulinar (RMC), e foliar (RMF) e área foliar específica (AFE) que são importantes componentes que influenciam na taxa de crescimento relativo (TCR). A TCR é um parâmetro usual para análise comparativa da *performance* entre plantas e/ou tratamentos, porém influenciada por um componente em análise pré-existente, enquanto que a taxa de assimilação líquida (TAL) está mais fortemente relacionada à fotossíntese líquida ou ao balanço líquido de C da planta dentro de um intervalo de tempo, sendo considerada a “média” do período, fornecendo assim um valor robusto com o desempenho total (e não pontual) da planta (HUNT, 1990; HOFFMANN; POORTER, 2002).

Alterações morfológicas geralmente são resultados de modificações lentas no padrão de diferenciação celular; e os dados anatômicos comparativos nos fornecem uma “visão” dos resultados dessas alterações no desenvolvimento das células e tecidos que em última instância é resultado de modificações metabólicas advindas da indução/repressão de processos fisiológicos associados à percepção ambiental. A integração desses componentes pode influenciar no acúmulo de biomassa da planta ou a sua morfologia. Portanto, justifica-se a interação de dados de crescimento com os anatômicos para avaliar a eficiência de crescimento

e habilidades de aclimação das plantas às condições que elas crescem. A interação entre os fatores ambientais e os fitormônios é a chave no processo de aclimação das plantas em diferentes ambientes.

Diante do exposto um dos principais hormônios vegetais associados às modificações em ambientes de sol e sombra são as GAs. Quimicamente são compostos constituídos de unidades básicas isoprenoides de cinco carbonos. GAs são um grupo de diterpenoides tetracíclicos considerado um hormônio vegetal envolvido na regulação e múltiplos processo de crescimento e desenvolvimento das plantas (YAMAGUCHI, 2008; DAVIES, 2010; RIBEIRO et al., 2012; HEDDEN; THOMAS, 2016). Os caminhos metabólicos de biossíntese e degradação de GAs seguem as rotas dos terpenoides (YAMAGUCHI, 2008; DAVIES, 2010; HEDDEN; THOMAS, 2016). A rota biossintética de GAs pode ser dividida em três estágios, cada qual residindo em compartimento celular diferente (HEDDEN; PHILLIPS, 2000; YAMAGUCHI, 2008). O *Estágio 1*, que ocorre em plastídeos; o *Estágio 2*, que ocorre na membrana dos plastídeos e no retículo endoplasmático; e o *Estágio 3*, que ocorre no citosol.

No *Estágio 1*, que ocorre nos plastídeos, quatro unidades de isoprenos são ligadas, formando uma molécula linear de 20 carbonos, o geranylgeranyl difosfato (GGPP). O GGPP então é convertido a um composto tetracíclico, o *ent*-kaureno, em duas etapas catalisadas pela *ent*-copalil-difosfato sintase (CPS) e *ent*-kaureno sintase (KS). No *Estágio 2*, que ocorre na membrana dos plastídeos e no retículo endoplasmático, o *ent*-kaureno, em uma sequência de reações é convertido na primeira giberelina formada, a GA<sub>12</sub>. Nessa parte da rota, a *ent*-kaureno oxidase (KO) e o ácido *ent*-kaurenoico oxidase (KAO) são duas enzimas chaves importantes. No *Estágio 3*, que ocorre no citosol, por meio de uma série de reações oxidativas, a GA<sub>12</sub> é convertida primeiramente em outras GAs-C<sub>20</sub> e, após, em GAs-C<sub>19</sub>, incluindo as GAs bioativas. Duas rotas principais foram identificadas neste estágio. Ambas compreendem a mesma série de reações oxidativas, exceto que os intermediários em uma rota têm -OH no carbono 13 (hidroxilação do C13), enquanto os intermediários da outra rota não possuem (não hidroxilação do C13) (YAMAGUCHI, 2008; DAVIES, 2010; HEDDEN; THOMAS, 2016).

De modo complementar, são conhecidas 3 principais enzimas que regulam a homeostase e biossíntese de GAs: GA 20-oxidase (GA20ox) e GA 3-oxidase (GA3ox), que catalisam as fases iniciais da biossíntese de GAs bioativas, e a GA 2-oxidase (GA2ox), envolvida na desativação de GAs. Elas são classificadas como dioxigenases e utilizam 2-

oxoglutarato (YAMAGUCHI, 2008; MARTINS, 2013; HEDDEN; THOMAS, 2016). Uma fina regulação metabólica em resposta aos níveis de GAs e luz faz com que a homeostase de GAs seja controlada por indução de genes GA2ox com feedback negativo da regulação bem como GA20ox e GA3ox induzidos por elevados níveis de GAs que desempenham papel regulatório para as vias dos terpenos e compostos fenólicos e influenciam no crescimento das plantas (HEDDEN; PHILLIPS, 2000; OLSZEWSKI; SUN; GUBLER, 2002; DAVIES, 2010; DAYAN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; KUREPIN; PHARIS, 2014; HEDDEN; THOMAS, 2016).

Tem-se relatado que GAs estão envolvidos na formação e diferenciação de fibras e elementos de vaso e alterações da arquitetura da parede celular, modificando o arranjo de microtúbulos pela interação com os vários fatores de interação dos fitocromos (PIFs) (LI et al., 2016) e o complexo prefoldina (DIXIT, 2013; LOCASCIO; BLÁZQUEZ; ALABADÍ, 2013) levando a degradação das proteínas DELLA (DIXIT, 2013; LI et al., 2016). Ainda, possivelmente ligado às auxinas, ao afrouxamento da parede celular que permite à expansão e divisão celular (DIXIT, 2013; LOCASCIO; BLÁZQUEZ; ALABADÍ, 2013). Recentemente relatou-se a descoberta da indução de genes *INCREASED CAMBIAL ACTIVITY* (ICA) responsáveis por maior atividade cambial em respostas às GAs (KIM et al., 2016) ICA estimula a diferenciação do crescimento axial e radial do caule que, em última instância, induz ao crescimento secundário e ao desenvolvimento de células do raio parenquimático e interfascicular do xilema (KIM et al., 2016).

Mesmo sendo um dos hormônios mais estudados junto com as auxinas (YAMAGUCHI, 2008; LAU; DENG, 2010; DAVIÈRE; ACHARD, 2013; HEDDEN; THOMAS, 2016), pouco tem sido caracterizado sobre o papel das GAs na participação direta, ou ainda indiretamente nas vias de sinalização e, principalmente do metabolismo primário (RIBEIRO et al., 2012; MARTINS, 2013) e sobre o sua atuação no controle da regulação da divisão (SAUTER; KENDE, 1992; ERIKSSON et al., 2000) e expansão celular (INADA; SHIMMEN, 2000).

Sabe-se que ocorre intenso *crosstalk* entre as rotas de sinalização promovidas pela luz e por hormônios (revisado por LAU; DENG, 2010). No escuro, as GAs, ligam-se ao seu receptor *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* (GID1) e medeiam a ubiquitinação das proteínas DELLA (ALABADÍ et al., 2008; LI et al., 2016). As proteínas DELLA são então, direcionadas para o proteassomo 26S para a degradação. Na ausência das proteínas DELLA, as PIFs (Fatores de Interação com os Fitocromos) podem agir tanto como reguladores

positivos quanto negativos da expressão gênica, provavelmente pela interação com proteínas diferentes, talvez mediados por diferentes elementos reguladores *cis* no promotor dos genes-alvo (LI et al., 2016). As proteínas PIF3 e PIF4 promovem a transcrição de genes que induzem o estiolamento e alongamento celular no escuro. Na luz, as proteínas DELLA ligam-se às proteínas PIF3 e PIF4, evitando sua interação com os elementos *cis* dos genes-alvo (DAVIÈRE; DE LUCAS; PRAT, 2008; DAVIÈRE; ACHARD, 2013). Desse modo, a ação das GAs na luz, promoveria o estiolamento via degradação das proteínas DELLA e a possibilidade de ação das proteínas PIF3 e PIF4 (LAU; DENG, 2010). As proteínas PHY (fitocromos) também interagem com as proteínas PIF, por meio da fosforilação, levando eventualmente, à sua ubiquitinação e degradação. Na ausência de proteínas PIF, os genes necessários para expansão celular não são expressos e o crescimento vegetal é retardado (LAU; DENG, 2010; LI et al., 2016).

Os estímulos ao alongamento celular são promovidos pelas interações entre GAs e auxinas que influenciam no processo de crescimento e desenvolvimento vegetal por meio do afrouxamento da parede celular e na biossíntese de polissacarídeos da parede. Segundo Ross e O'Neill (2001), as auxinas podem induzir a síntese de outros hormônios com as GAs. A partir de experimentos com a decapitação do caule de ervilhas, eliminava a capacidade de sintetizar GA<sub>1</sub> a partir do seu precursor GA<sub>20</sub>. Sabe-se que GAs tem efeito sob o alongamento celular e sugere-se que as auxinas atuam de forma sinérgica para promover a expansão celular (ROSS; O'NEILL, 2001). No que tange a participação de auxinas e GAs na diferenciação celular, tem-se relatado que a formação de elementos de vasos encontra-se relacionada a participação das auxinas enquanto GAs estimulam a formação de fibras, com participação ativa do câmbio vascular em plantas de tabaco (ALONI, 1987; DAYAN et al., 2012). Além disso, tem-se demonstrado que o desfolhamento e decapitação do ápice caulinar, seguida por aplicação exógena de GA<sub>3</sub> rapidamente induz a diferenciação de fibras e desenvolvimento secundário do xilema (ALONI; TOLLIER; MONTIES, 1990; DAYAN et al., 2012) e que a auxina não consegue restaurar o crescimento secundário em caules, indicando o papel central das GAs na promoção da diferenciação de fibras e, crescimento e diferenciação secundário do caule. Além disso, considera-se que GAs e outros hormônios como as citocininas participam da promoção da síntese da enzima xiloglucano endotransglicosilase (XET) responsável por modificações do arranjo dos xiloglucanos da parede celular (ALONI, 1987; ALONI; TOLLIER; MONTIES, 1990; DAYAN et al., 2012).



As GAs exógenas são capazes de substituir a indução fotoperiódica ao serem aplicados em plantas de dias longos que crescem sob a forma de rosetas quando submetidas a dias curtos. Além disso, o fenótipo é acompanhado pelo alongamento do caule e emissão do escapo floral. O comprimento do dia e também do nível de luz influenciam no metabolismo de GAs. Em condições de dias curtos, os níveis de GAs são baixos e as plantas mantêm a forma de roseta, por outro lado, em dias longos observa-se aumento nos níveis de GAs (YAMAGUCHI, 2008; HEDDEN; SPONSEL, 2015).

Um dos trabalhos pioneiros e fundamentais no entendimento dos efeitos das GAs sobre o ciclo celular foi de Sauter e Kende (1992) no qual os autores propuseram que o efeito primário das GAs relaciona-se com a indução do alongamento celular do meristema intercalar, processo esse que é seguido por ciclos de divisões celulares, que ocorrem, inicialmente, a partir das células que tiveram seu DNA duplicado e que, em consequência, estão na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular. O aumento do número de células da fase G<sub>2</sub> indica um estímulo geral para a divisão celular (SAUTER; KENDE, 1992). Além disso, após 4 horas de tratamento com GAs ocorre uma diminuição do número de células da fase G<sub>2</sub>, sugerindo que esse hormônio regula o ciclo celular a transição entre a mitose e a fase G<sub>2</sub>. Sabe-se que a transição entre as diferentes fases do ciclo celular é regulada por proteínas cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Ainda, Sauter e Kende (1992) mediram os níveis transcricionais de dois genes que codificam CDKs e mostraram aumento dos níveis desses genes em resposta às GAs exógenas. Esse aumento foi correspondente à expressão de dois genes associados à atividade mitótica, sugerindo que GAs estimulam a divisão celular bem como ciclinas necessárias para a mitose e formação de novas células (SAUTER; KENDE, 1992).

A luz é essencial para o crescimento das plantas e ela própria tem efeitos sob a deposição de lignina. Foi demonstrado em *Ebenus cretica* L. cultivadas ambiente controlado de luz que as plantas apresentavam 2,5 vezes mais lignina do que mudas cultivadas no escuro (SYROS; YUPSANIS; ECONOMOU, 2005). Demonstrou-se em plantas de soja expostas a diferentes intensidades de luz e fotoperíodo no qual evidenciou aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lignina, bem como níveis mais elevados da atividade de diamina oxidase e peroxidases (POD) (ANDERSSON-GUNNERÅS et al., 2006). Foi demonstrado também que a diferenciação de traqueídes em calos de *Pinus radiata* apresentou efeito positivo da luz sobre a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) no qual resultou aumento na concentração de lignina quando os calos foram transferidos do

escuro para a um fotoperíodo de 16h (CHEN et al., 2002; MOURA et al., 2010). Ainda, a exposição à luz contínua aumenta a atividade de PODs e lacases aniônicas e catiônicas em hipocótilos de feijão resultando em aumento dos teores de lignina (MOURA et al., 2010). Em orquídeas tratadas durante 30 dias com diferentes intensidades luminosas (60 e 340  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) tenderam a aumentar os teores de lignina associados positivamente com maior atividade da PAL, CAD e superóxido dismutase (SOD) (AKGUL; ÇOPUR; TEMIZ, 2007). Além disso, tem-se mostrado que GAs interferem a deposição de lignina por meio da maior atividade de enzimas como PAL, CAD (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; GUO et al., 2015) indicando *crosstalk* entre diferentes mecanismos para a estimulação da lignificação, crescimento e desenvolvimento dos diferentes órgãos da planta (MOURA et al., 2010; KUREPIN; PHARIS, 2014)

Associar altas taxas de crescimento, impulsionados por luz e GAs devem alterar a alocação de C para formação da parede celular de modo a sustentar o próprio crescimento vegetal. As células vegetais são delimitadas por uma parede mecanicamente forte (YANG et al., 2015). Essa camada, que pode alterar-se em resposta a luz ou GAs é formada por uma rede de fibrilas de celulose embebida em uma matriz de polissacarídeos que são secretadas pelas células (VANHOLME et al., 2012; YOON; CHOI; AN, 2015). A matriz de polissacarídeos e fibrilas de celulose se unem em uma forte rede de uma mistura de ligações covalentes e não covalentes (VANHOLME et al., 2012). A parede celular ainda cumpre as seguintes funções de regulação do volume celular, determinação da forma e proteção do protoplasto.

Depois da celulose, a substância orgânica mais abundante nas plantas é a lignina, um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificados (YOON; CHOI; AN, 2015). A lignina desempenha funções primárias e secundárias nos vegetais. Sua estrutura precisa não é conhecida devido à dificuldade de extrair lignina das plantas, onde está covalentemente ligada à celulose e a outros polissacarídeos da parede celular (VANHOLME et al., 2010). A lignina é, em geral, formada por três diferentes álcoois de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapil, todos sintetizados a partir da fenilalanina mediante vários derivados do ácido cinâmico (VANHOLME et al., 2010; YOON; CHOI; AN, 2015). A lignina é encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecidos de sustentação e condução, especialmente em traqueídes, fibras e nos elementos de vaso (VANHOLME et al., 2010, 2012; FERREIRA et al., 2017). Ela é depositada, sobretudo, no espessamento da parede secundária, mas também, pode estar presente na parede primária e na lamela média, em íntimo contato com a celulose e

hemicelulose já presentes. A rigidez mecânica da lignina fortalece os caules e o tecido vascular, permitindo o crescimento ascendente e possibilitando que a água e os sais minerais sejam conduzidos pelo xilema sob tensão, sem haver o colapso do tecido (VANHOLME et al., 2010; MARTINEZ-VILALTA et al., 2014; LARTER et al., 2015).

Devido à importância de se conhecer melhor a alocação de C sob diferentes ambientes e em resposta a manipulação dos níveis de GAs, objetivou estabelecer em aspecto ecofisiológico às estratégias da eficiência da captura de luz, acúmulo de biomassa e modificações anatômicas, em especial alterações promovidas nas fibras do xilema secundário (FX), visto que GAs e luz afetam vários processos biológicos aparentemente não relacionados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Fisiologia Vegetal, Bioquímica de Plantas (BioPlan), Histotécnica Vegetal, Ecologia Energética, Complexo de Apoio à Pesquisa (COMCAP) e no Centro de Tecnologia de Irrigação da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

#### 3.1. Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Havana 425) do tipo selvagem (WT). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Centro Tecnológico de Irrigação na Universidade Estadual de Maringá (CTI – UEM). Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. HAV 425) foram dispostas em placa de *petri* e germinadas a temperatura ambiente. As plântulas obtidas foram transferidas para copos plásticos descartáveis de 50 mL e cultivadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) à 23°C. Plântulas com 4 folhas foram transferidas para potes de 300 mL contendo substrato comercial para plantas e aclimatadas em casa de vegetação. Mudanças com aproximadamente 5-6 folhas expandidas (maiores que 5cm de comprimento) foram selecionadas, pela uniformidade, sanidade e vigor. Em seguida foram transplantadas em potes plásticos de 5L contendo solo de textura média e adubação a base de N, P e K. Todas as plantas eram frequentemente irrigadas conforme a necessidade e cuidados fitossanitários feitos quando necessário.

#### 3.2. Delineamento experimental e montagem dos experimentos

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6x2 constando com dois níveis de luz e seis “níveis hormonais”. Os tratamentos foram denominados de alta irradiância (a pleno sol) ( $A_{IR}$  – 100% luz) e baixa irradiância (sombra) ( $B_{IR}$  – 8,5% de luz). Usou-se duas malhas de tipo sombrite 50% e 80%, sobrepostas formando uma cobertura completa sobre as plantas (incluindo as laterais), que somadas propiciaram 91,5% de sombreamento em relação ao interior da casa de vegetação que estavam as plantas  $A_{IR}$ . A qualidade espectral não foi alterada nessa condição (dados não mostrados). Foram aplicadas às plantas, via pulverização foliar, soluções contendo diferentes concentrações de ácido giberélico ( $GA_3$ ) e aplicação no solo uma solução contendo paclobutrazol (PBZ). As plantas foram submetidas a pulverização de solução contendo  $GA_3$  (0 [água destilada; controle], 10 e 100  $\mu M$   $GA_3$  planta<sup>-1</sup>), aplicados a cada 2 dias, no intervalo

de 10 dias (RIBEIRO et al., 2012). O paclobutrazol (PBZ – inibidor da síntese de GAs) foi aplicado de uma única vez em volume de 500 mL por vaso na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> (25 mg PBZ vaso<sup>-1</sup>, em solução aquosa). Ainda as combinações entre GA<sub>3</sub> e PBZ, conforme Ribeiro *et al.*, (2012) com ajustes para o volume de vaso.

Dessa forma os tratamentos foram:

- 1) Controle (Cont),
- 2) GA<sub>3</sub> 10 µM (GA10),
- 3) GA<sub>3</sub> 100 µM (GA100),
- 4) PBZ 50 mg L<sup>-1</sup> (PBZ),
- 5) GA10+PBZ (GA10P) e
- 6) GA100+PBZ (GA100P)

Todos com dois níveis de luz, formando um esquema fatorial 2x6 (luz vs GAs) totalizando 12 tratamentos com 6 repetições.

As plantas foram avaliadas durante períodos regulares da fase exponencial (vegetativa) de crescimento até ao 20º dia a partir da aplicação dos tratamentos.

### 3.3. Análise de crescimento

Avaliaram-se os parâmetros de crescimento durante a fase vegetativa da planta. Foram realizadas análises não-destrutivas para medição da área foliar a cada 5 dias em todas as plantas, medindo-se comprimento e largura de cada folha, e a área foliar estimada segundo a equação [ $AF = k * C * L$ ], sendo AF a área foliar,  $k$  (0,70014) um fator de correção,  $C$  o comprimento máximo do limbo e  $L$  a largura máxima da folha (ANTUNES et al., 2017) com modelo ajustado para *N. tabacum* HAV 425. Em intervalos de 10 dias foram coletadas 72 plantas (6 plantas de cada tratamento) para análise de crescimento destrutiva, com a quantificação da matéria seca da raiz, caule, folha e total da planta pela soma das frações anteriores. Foram medidos ainda o diâmetro e o comprimento do caule e da raiz em 2 períodos do ciclo da cultura (total 20 dias). Para obtenção da matéria seca as frações foram colocadas em estufa de ventilação forçada, a temperatura de 70°C até peso constante e quantificadas em balança digital analítica. Os parâmetros de crescimento e fisiológicos foram estimados segundo método descrito por HUNT, (1990); HOFFMANN; POORTER, (2002); SILVA et al. (2013).

#### 3.4. Determinação da interceptação de luz

Calculou-se a densidade volumétrica do dossel, considerando a parte aérea da planta com projeção de um cone, calculado pela fórmula,  $V_{cone} = \frac{1}{3} \pi r^2 h$ , considerando o raio (r) como o comprimento da maior folha e (h) altura do caule, compondo a densidade de área foliar que compõe à relação da área por volume (cm<sup>2</sup> folha / cm<sup>3</sup> de planta).

#### 3.5. Determinação dos teores de pigmentos foliares

Segmentos de 2 cm<sup>2</sup> do limbo, da quarta ou quinta folha totalmente expandida a partir do ápice caulinar, foram utilizados para quantificação dos teores de clorofilas e carotenoides totais. A extração foi realizada imediatamente após a coleta dos segmentos, com imersão no escuro e em temperatura ambiente, por aproximadamente 18-20 horas em solução de acetona 80% saturada com CaCO<sub>3</sub>. Para leitura do espectro de absorção (400 a 700 nm) dos pigmentos foliares extraídos utilizou-se espectrofotômetro (Shimadzu UV-2450 com software UV-Probe v.2.34, Shimadzu Corporation, Japan). As concentrações de clorofilas e carotenoides foram estimadas, segundo equações matemáticas descritas por Lichtenthaler (1987) selecionando os comprimentos de onda de 470, 647 e 663 nm. Segmentos similares aos usados para extração dos pigmentos foram coletados, colocados em estufa a 70°C e quantificados em termos de matéria seca para avaliação e expressão dos dados com base em massa.

#### 3.6. Determinação dos dados de reflectância, absorbância e transmitância da luz

Dados de reflectância (R) e transmitância (T) foram avaliados diretamente por meio do acoplamento de dois espectrorradiômetros (ASD Inc; Fild Spec®, USA) calibrados e colimados imediatamente antes do uso. Aplicou-se então um feixe de luz de aproximadamente 2.000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> em um dos sensores (aquele posicionado na face adaxial da folha) e então efetuado as leituras de 350 a 2500 nm simultâneas tanto de reflectância quanto de transmitância. Considerou-se então a absorbância (A) como sendo a fração calculada pela equação  $[A = 1 - (R + T)]$ . Foram realizadas duas leituras por folha (uma de cada lateral do limbo) e considerou-se a média como unidade experimental. Selecionou os pontos referentes a curva espectral da luz visível do azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) e estimou-se os dados de absorbância da folha (Abs<sub>r</sub>) e correlações entre pigmentos foliares extraídos em relação aos tratamentos aplicados.

### 3.7. Análises anatômicas

#### 3.7.1. Microscopia de luz

Para avaliação das características anatômicas, foram coletadas amostras de folha e caule. Da folha, foram coletadas da porção mediana do limbo aproximadamente 3-4 cm<sup>2</sup> da quarta folha totalmente expandida a partir do ápice caulinar. Para o caule foram coletadas secções das porções basal de tamanho aproximado 5-6 cm<sup>3</sup>. Ambas as coletas ocorreram na última avaliação, ao 20º dia após o tratamento. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965).

Após a fixação, procedeu-se com o seguinte método: segmentos de folhas e caules com 2 cm<sup>2</sup> foram cortados e preservados em álcool 70% e posteriormente submetidas à desidratação utilizando-se séries com concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 3x com 100%). Em seguida procedeu-se a infiltração e inclusão em metil-metacrilato (Leica®, Historesin). As amostras foram seccionadas em micrótomo de rotação manual (espessura 8µm), coradas com azul de toluidina em tampão acetato pH 4,7 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e untadas com resina sintética Verniz Vitral Incolor® (SOUZA et al., 2005; PAIVA et al., 2006). As imagens digitais foram obtidas em microscópio (Leica) acoplado a um computador com o software Leica Application Suite®. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image-Pro-Plus® v.4.5 e calibrados com uso de lâmina de referência de medição.

#### 3.7.2. Microscopia de fluorescência

##### 3.7.2.1. Análise com material incluído em PEG

Segmentos de 3cm<sup>3</sup> de caule da região basal foram fixadas em solução Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965). As amostras de caule foram lavadas em água destilada por 3x durante 5 minutos. Após o procedimento de reidratação as amostras foram colocadas em recipientes de vidro e então adicionado uma solução aquosa de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) 25% (p/v) e o material colocado em uma estufa a 60°C. Quando a metade do volume inicial de solução havia sido alcançada, uma solução de PEG 6000 75% (p/v) foi adicionada. Quando a solução novamente havia retornado a metade do volume, os fragmentos foram incorporados em uma solução de 90% PEG 6000 e goma arábica. Os fragmentos de caule foram posicionados em cassetes montados em base de madeira e fita adesiva, e imediatamente

levadas ao congelador (-4°C). As amostras foram deformadas e cortadas em micrótomo de rotação manual (espessura 25 – 35 µm) e os cortes distendidos em placa com água entre 35 – 50°C (SOUZA et al., 2005; FERREIRA et al., 2017). A coloração utilizada foi azul de astra e safranina/fucsina Básica 1% (p/v) (KRAUS et al., 1998) e os cortes montados entre lâmina e lamínula com glicerina 50%. As imagens digitais foram obtidas em microscópio de epifluorescência EKB-2F (Eikonol Ind., São Paulo, Brazil) com comprimento de onda de excitação azul (460 – 490nm) (FERREIRA et al., 2017) e filtro B. As imagens foram processadas com auxílio do software Bel Eurisko (Bel Photonics, Piracicaba, Brazil) (FERREIRA et al., 2017) e analisados de forma qualitativa com auxílio do software Image-Pro-Plus® v.4.5.

#### 3.7.2.2. Análise da fluorescência da parede celular de caule infiltrados em historesina

Segmentos de caule com 2 cm<sup>3</sup>, previamente fixados em solução Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), preservadas em etanol 70%, posteriormente desidratadas em série etanólica e infiltradas e em metil-metacrilato e cortadas em espessura 8 µm conforme descrito anteriormente, foram submetidas a dupla coloração com Calcofluor Bright White 28 (0,01%, p/v) e Auramina O (0,01%, p/v) (IBRAHIM, 2001), para celulose e lignina, respectivamente. Para visualizar as células parenquimáticas celulósicas e lignificadas procedeu-se da seguinte maneira: em primeiro lugar os cortes foram imersos em solução de Auramina O 0,01% (p/v) por 20 segundos, lavados com água destilada e em seguida submetidas a coloração com Calcofluor Bright White 28 0,01% por 10 minutos. Montou os cortes com lamínula e água e visualizou imediatamente em microscópio de fluorescência Zeiss, Axiostar Plus com filtro 2 no UV acoplado a uma câmera digital (Axiocam). As medidas foram realizadas com auxílio do software Image-Pro-Plus® v.4.5.

#### 3.7.3. Maceração

Para análise qualitativa e quantitativa das fibras foi empregada a técnica de maceração ácida (KRAUS; ARDUIN, 1996). Para tanto, fragmentos de caules fixados em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) foram colocados em frascos de vidro de 20 mL contendo uma solução ácida na proporção 1:1 contendo ácido crômico 10% (v/v) e ácido nítrico 10% (v/v) (Solução de Jeffrey) (JOHANSEN, 1940). Após 6 horas de maceração, realizou 5 lavagens de 5 minutos com água destilada. Adicionou água ao macerado e uma solução de conteúdo celular foi obtida. Retirou-se uma alíquota da solução principal e adicionou em um



tubo eppendorf com glicerina 50% e solução de safranina 0,5% (m/v) (KRAUS; ARDUIN, 1996; SOUZA et al., 2005). Uma alíquota do conteúdo celular corado foi disposta entre lâmina e lamínula. As imagens digitais foram obtidas em microscópio (Leica) acoplado a um computador com o software Leica Application Suite®. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image-Pro-Plus® v.4.5.

#### 3.7.4. Microscopia eletrônica de varredura

Para análise da ultraestrutura da região basal do sistema vascular dos caules de plantas de tabaco, segmentos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> da coleta feita ao 20º dia de imposição dos tratamentos, foram fixadas em solução Karnovsky modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965; KIERNAN, 2000). Para melhor fixação as amostras foram submetidas ao vácuo para remoção do ar de seus tecidos e mantidas na solução por no mínimo 24 horas. Posteriormente as amostras foram infiltradas em diferentes concentrações com um crioprotetor (glicerol 10, 20 e 30%) até os fragmentos afundarem. Mergulhou-se então os fragmentos em nitrogênio líquido e procedeu-se a fratura com bisturi, depositando os fragmentos em recipiente com água destilada. Procedeu-se a desidratação das amostras utilizando-se séries crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90%) durante 1 hora e 3x (100%) durante 10 minutos. Realizou a secagem em ponto crítico Bal-Tec CPD-030 (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Montou-se as amostras em “*stubs*” e metalizou-se com ouro em evaporador MED010 Balzers (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Finalmente as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550 (Shimadzu, Tokyo, Japão) disponível no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP – UEM) da Universidade Estadual de Maringá. As imagens digitais foram obtidas com auxílio do software SS-550 acoplado ao microscópio e analisadas de forma qualitativa.

#### 3.8. Análise calorimétrica

Para quantificações do conteúdo calorimétrico foram coletadas separadamente a matéria seca de cada fração das plantas (raiz, caule e folha) aos 20 dias após aplicação dos tratamentos. As frações foram trituradas em moinhos de facas (MA048, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda, Brazil) e acondicionadas em tubos falcon. As amostras foram novamente secas em estufa a 70°C e finalmente calcinadas em bomba calorimétrica adiabática Parr 6100 (Parr Instrument Company, Illinois, EUA) em atmosfera de oxigênio

puro. O poder calorimétrico total da planta (kcal) foi estimado pela somatória da respectiva fração de massa (g) multiplicado pelo valor calorimétrico de cada fração ( $\text{cal g}^{-1}$ ) da planta.

### 3.9. Quantificação dos teores de lignina

A quantificação de lignina foi determinada pelo método de acetil bromida conforme Moreira-Vilar *et al.* (2014). Pesou 150mg de matéria seca do caule, previamente armazenada homogeneizando em 50mM tampão fosfato de potássio (3,5mL, pH 7,0) e transferido para tubos de centrífuga. Em cada etapa realizada, centrifugou-se a 1400xg, 5min, lavando 4x com tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 3,5mL), 4x com 1% (v/v) Triton X-100 pH 7.0 (3,5mL), 3x com 1M NaCl em tampão pH 7.0 (3,5mL), 2x com água destilada (3,5mL) e 2x com acetona (5mL). O *pelet* foi seco em estufa (60°C, 24h). A matéria seca obtida foi definida como fração da parede celular isenta de proteína (PCIP). A PCIP ainda é considerada livre de compostos solúveis em água (polares) e solúveis em acetona (apolares como lipídeos). Após esse procedimento, 20mg da PCIP foi adicionado em tubos de centrífuga com 0,5mL de acetil bromida (25%, v/v em ácido acético glacial) e incubado a 70°C por 30 min. A reação de digestão foi paralisada em gelo, e uma mistura de 0,9mL de NaOH (2M), 0,1 mL de hidroxilamina-HCl (5M) foi adicionada. Ainda, houve adição de volume suficiente de ácido acético glacial para completa solubilização da lignina extraída (6mL, gelado). Centrifugou-se a 1400xg por 5 min. e realizou-se a leitura de absorção a 280 nm do sobrenadante. A curva padrão foi obtida com Alcalli lignina (Aldrich 37, 096-7) e o valor da absorvidade ( $\epsilon$ ) foi obtido, sendo  $22.9 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos como  $\text{mg lignina g}^{-1}$  da PCIP.

### 3.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos dos respectivos tratamentos foram submetidos às análises estatísticas ANOVA *One-Way* para média entre tratamentos. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em comparação múltiplas e entre os efeitos da intensidade de luz e GA<sub>3</sub> foram analisados utilizando testes estatísticos teste *t* de Student e de Duncan respectivamente. Além disso, foi utilizada a correlação de Pearson quando necessária, sendo considerada significativa quando  $p \leq 0,05$ . Os gráficos foram elaborados com auxílio do software Sigma Plot 10.0 (Systat Software).

### 3.11. Análise multivariada

Procedeu-se a análise de componentes principais (PCA) de modo a reduzir a dimensionalidade dos dados e propiciar ao conjunto de variáveis auto-correlacionadas, testes estatisticamente mais estáveis que outras formas de regressão. Buscou-se no conjunto de variáveis qual é a contribuição individual para a explicação dos teores de lignina extraída do caule das plantas. Utilizou-se a rotina do Statistica® 10.0 em dados brutos e não transformados. Utilizaram-se os dados primários da análise de crescimento coletados aos 20 dias após imposição dos tratamentos, dados derivados da análise de crescimento (após algum procedimento matemático como relações), dados de concentração de pigmentos, dados anatômicos e calorimétricos para processar a análise multivariada. Não se procedeu a rotação de vetores. Usaram-se apenas os dois primeiros componentes principais para as demais caracterizações derivadas da PCA. Com o uso dos autovetores (correlação linear entre uma variável com um componente principal) e autovalores (quadrado do autovetor) foi possível derivar estatisticamente qual a magnitude de explicação de uma variável particular (ou grupos) para a lignificação do caule das plantas. Os dados dos escores estimados pelo componente principal 1 (PCA1) e componente principal 2 (PCA2) foram submetidos a MANOVA Bifatorial e, se significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), foram então submetidos à comparação de média pelo teste de Duncan ou *t* de Student, sendo considerado significativo a uma probabilidade de erro inferior a 5%.

## 4. RESULTADOS

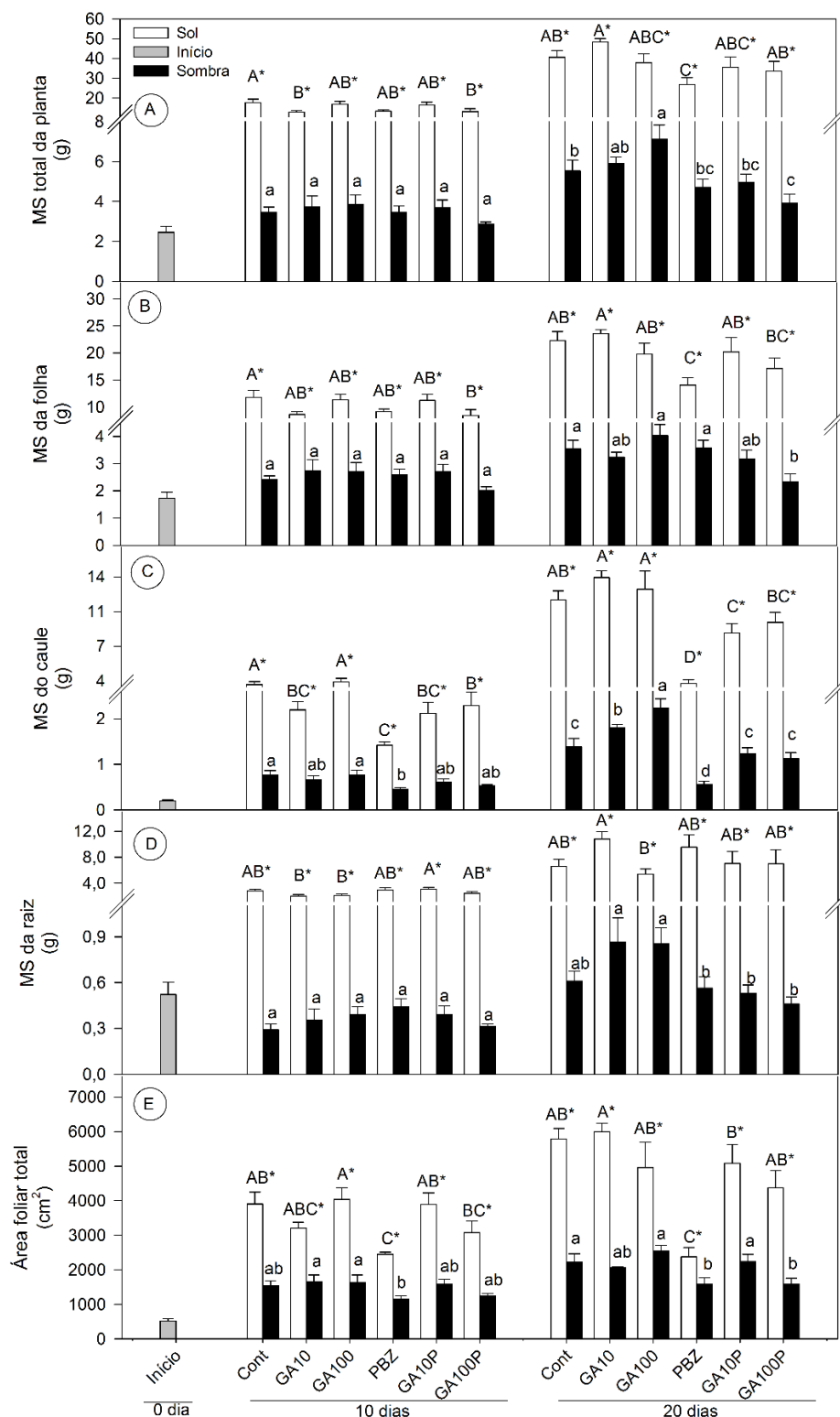
### 4.1. Análises fisiológicas e parâmetros de crescimento

A partir análise visual de plantas de tabaco cultivadas em ambientes de sol e sombra e, sobre influência da aplicação direta de GA<sub>3</sub> e PBZ, em diferentes combinações que supostamente suportariam diferentes níveis endógenos de GAs (altos ou baixos) nos tecidos das plantas, identificou-se um padrão de crescimento bastante diferenciado e característico entre os tratamentos aplicados (Figura 1). As diferenças morfológicas observadas ocorreram tanto pela manipulação da quantidade de luz quanto aos níveis de GAs nessas plantas em todos os tratamentos, incluindo as combinações, confirmando que esses componentes são capazes de influenciar o crescimento e desenvolvimento vegetal.



**Figura 1** – Imagem representativa de plantas de tabaco cultivadas em ambientes de alta (A<sub>IR</sub> – 100% de luz) e baixa (B<sub>IR</sub> – 8,5% de luz) irradiâncias com diferentes concentrações de Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) e Paclobutrazol (PBZ). Da esquerda para a direita, os fenótipos de plantas de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (intercalados) e os tratamentos Controle (Cont), GA<sub>3</sub> 10 µM (GA10), GA<sub>3</sub> 100 µM (GA100), Paclobutrazol 50 mg L<sup>-1</sup> (PBZ), GA<sub>3</sub> 10 µM + PBZ (GA10P) e GA<sub>3</sub> 100 µM + PBZ (GA100P), respectivamente.

De maneira geral, plantas nas quais foram aplicados maiores teores de GA<sub>3</sub> isoladamente ou em combinação com paclobutrazol (PBZ) em relação ao controle, apresentaram variações em características morfológicas ao longo do ciclo de crescimento (0 a 20 dias) tanto em ambientes de sol quanto sombra em termos de alocação e distribuição da matéria seca entre os órgãos vegetativos (Figuras 2, 3 e 4).



**Figura 2** – Acúmulo de matéria seca (MS) total da planta (A); da folha (B); do caule (C); da raiz (D) e da área foliar total (E), em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações (Cont, GA10, GA100, PBZ, GA10P e GA100P, para mais detalhes das siglas veja na Figura 1) e em sol e sombra nas seguintes irradianças (100 e 8,5%, respectivamente) ao 10º e 20º dias após imposição dos tratamentos. Médias seguidas de letras maiúsculas ou minúsculas distintas representam diferenças estatísticas pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) na mesma irradiança e entre diferentes níveis de giberelinas (GAs). Asteriscos sobre as médias representam diferenças estatísticas pelo teste *t* de Student ( $p \leq 0,05$ ) entre distintas irradianças no mesmo nível de GAs.  $n=6 \pm SE$ .

No 10º dia após início dos tratamentos, os efeitos promovidos pela luz e GAs apresentaram diferenças significativas quanto ao acúmulo de matéria seca (MS) do caule (Figura 2C), área foliar (Figura 2E), comprimento do caule (Figura 3B), dos entrenós (Figura 3C) e diâmetro do caule (Figura 3D), porém outros como MS do sistema radicular e comprimento da maior raiz (Figuras 2D e 3E) não tiveram alterações relevantes. Todavia, após 20 dias de início dos tratamentos, alterações foram evidenciadas no ganho de MS total (Figura 2A), da folha (Figura 2B), do caule (Figura 2C), da raiz (Figura 2D) e da área foliar (Figura 2E) e também em relação à altura total (Figura 3A), comprimento, diâmetro e entrenós do caule (Figuras 3B, 3C e 3D) e raiz (Figura 3E) em plantas cultivadas em diferentes disponibilidades de luz e com GA<sub>3</sub> e/ou PBZ.

O acúmulo de MS, no 20º dia de plantas tratadas com maiores doses de GA<sub>3</sub> (GA100) indicou leve redução em plantas de sol e aumento para as de sombra da MS de folha (-11,3% e 13,8%, Figura 2B), raiz (-18,3% e 39,3%, Figura 2D), total da planta (-6,65% e 28,5%, Figura 2A) e área foliar (-14,2% e 13,1%, Figura 2E) em relação aos seus respectivos controles nos ambientes de sol e sombra. Desse modo o único componente que teve incremento em MS tanto em plantas de sol quanto as de sombra foi da MS do caule (9,1% e 61,6%, Figura 2C) para GA10 e GA100. Ademais, os tratamentos com menores doses de GA<sub>3</sub> (GA10) tiveram incrementos levemente superiores para todos os componentes de MS citados anteriormente em relação ao controle (Figura 2) e aos ambientes de sol e sombra.

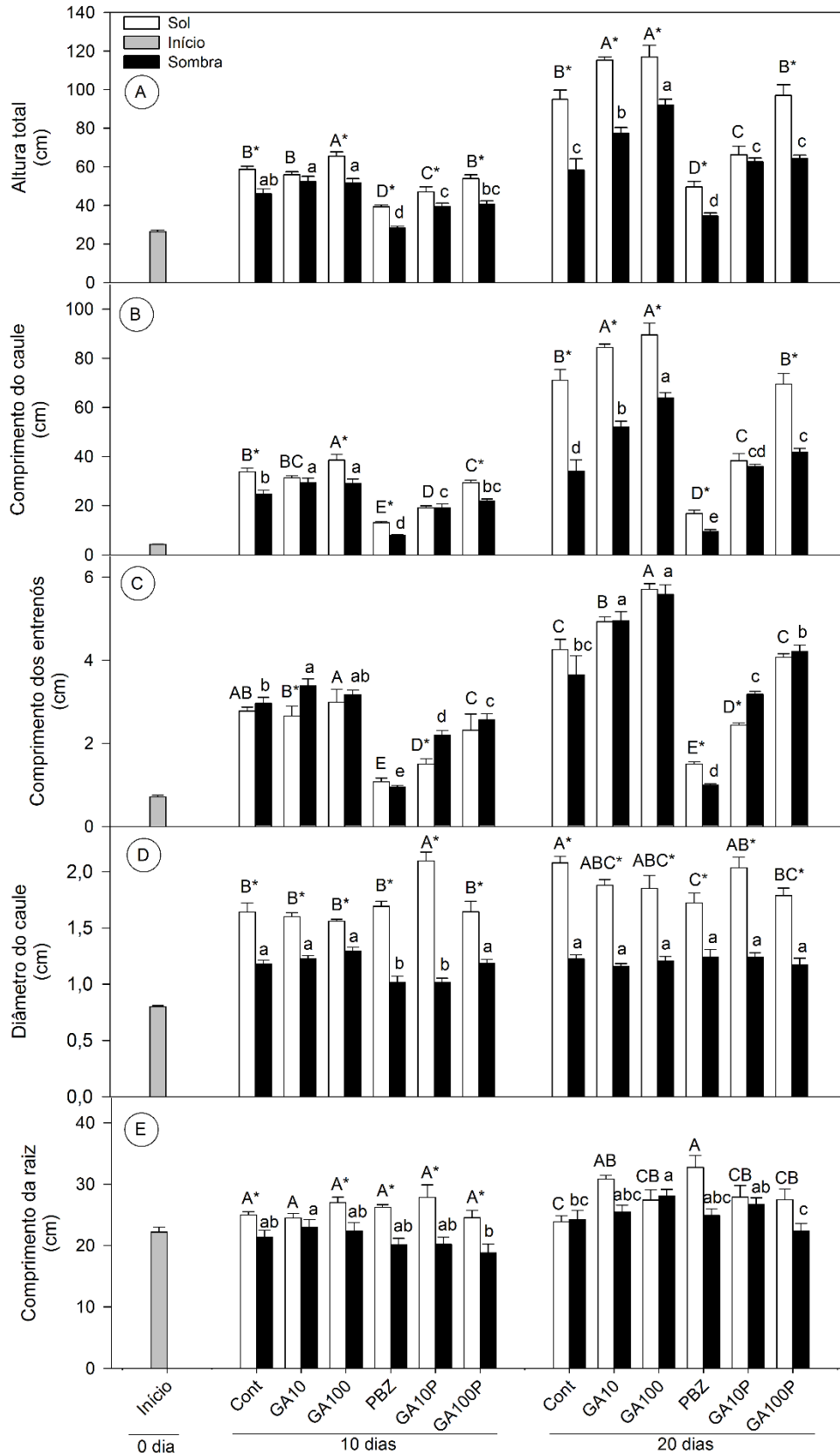
Por outro lado, as plantas tratadas isoladamente com PBZ em relação ao controle observou-se redução da MS total (-33,7% e -26,4%, Figura 2A), do caule (-72,36% e -60,1%, Figura 2C) e área foliar (-58,9% e -28,7%, Figura 2E) tanto para as plantas cultivadas à pleno sol quanto na sombra, respectivamente.

Em contraste, comparando ambientes a A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> Cont e tratadas com, PBZ e GA100 evidenciam aumento da MS total (627%, 477% e 421%, Figura 2A), folha (537%, 310% e 358%, Figura 2B), caule (740%, 487% e 469%, Figura 2C), raiz (978% 1569% e 531%, Figura 2D) e área foliar (160,4%, 50,3% e 94,1%, Figura 2E) para as plantas de sol em relação às de sombra que acumularam menos MS total, aos 20 dias após aplicação dos tratamentos respectivamente. Evidencia-se que luz influencia no acúmulo de MS tanto quanto os níveis de GA, respectivamente.

Ressalta-se que aplicação foliar de GA<sub>3</sub> foi capaz de reverter parcialmente o efeito do PBZ em relação ao ganho de MS e área foliar em plantas de ambientes de sol quanto nas de sombra (Figura 2).

De forma dependente de dose, evidencia-se que as plantas GA10 e GA100, em A<sub>IR</sub>, aumentaram em 19,4% e 26,2% o comprimento do caule (Figura 3B), respectivamente em relação ao controle, enquanto tratadas somente com PBZ a redução chegou a 76,3%. Por outro lado, a aplicação de GA<sub>3</sub> em plantas submetidas ao paclobutrazol (GA100P) mostrou-se que GA<sub>3</sub> exógeno promoveu recuperação do fenótipo para o comprimento do caule (Figura 3B), mas sem expressividade em GA10P, ambos em relação ao controle em plantas de ambiente de sol.

Em ambiente sombreado, plantas submetidas aos tratamentos GA10 e GA100 aumentaram de forma expressiva do comprimento do caule (Figura 3B), em 52,5% e 87,7%, ao passo que PBZ teve redução de 70,9% (Figura 3B), todos comparados ao controle. Ademais, GA100P em plantas de ambientes de sombra houve recuperação do fenótipo com aumentos significativos de 22,9% no comprimento do caule (Figura 3B), ao passo que em GA10 as plantas de sombra não sofreram alterações expressivas em relação ao controle assim como já relatado em A<sub>IR</sub>.



**Figura 3** – Parâmetros de crescimento: altura total da planta (A); comprimento do caule (B); dos entrenós (C); diâmetro do caule (D) e da raiz (E), em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.



De forma semelhante ao descrito para comprimento do caule (Figura 3B), tanto à altura total da planta (Figura 3A) quanto o comprimento dos entrenós (Figura 3C) tiveram aumentos quando submetidos a maiores níveis de GAs e/ou redução destes quando associados ao PBZ. Além disso, mostrou-se que aplicação de GA<sub>3</sub> reverte o efeito do inibidor (PBZ) tanto em plantas de sol quanto de sombra de modo dependente de dose (Figura 3).

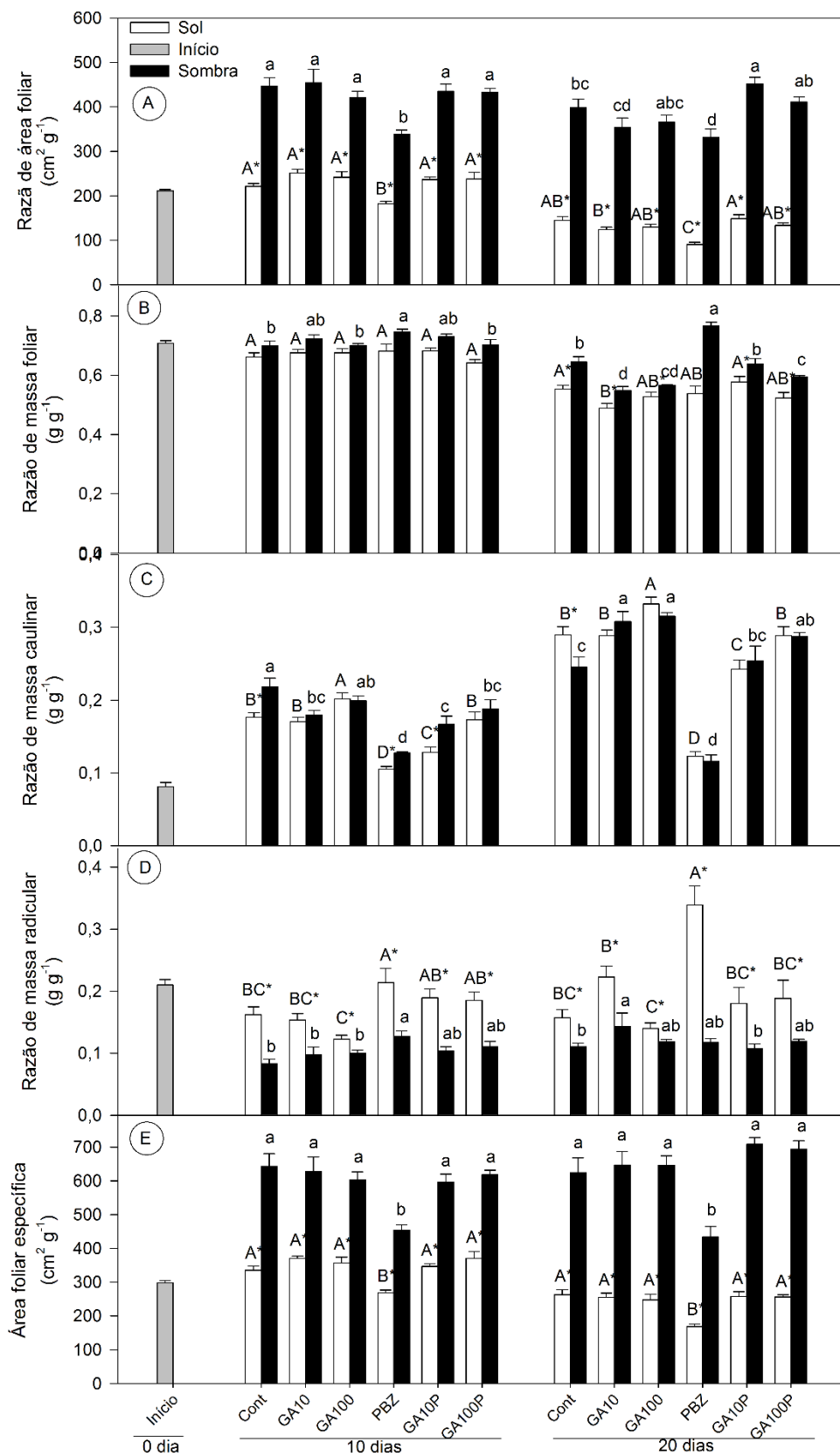
Observaram-se alterações significativas entre ambientes de sol e sombra na razão de área foliar (RAF), razão de massa radicular (RMR) e área foliar específica (AFE). Em resposta à irradiância de cultivo, mostra-se que em B<sub>IR</sub> as plantas tiveram aumentos em RAF de 174,5%, 182,9%, 264,8% e 209,2% para Cont, GA100, PBZ e GA100P em relação as plantas de sol, respectivamente (Figura 4A). De forma similar, as plantas aumentaram a AFE em 137,2%, 161,3%, 158,3% e 171,1% para Cont, GA100, PBZ e GA100P (Figura 4E), respectivamente comparando plantas B<sub>IR</sub> e A<sub>IR</sub>. Por outro lado, verificou apenas alterações não-significativas ( $p > 0,05$ ) para as razões de massa foliar (RMF) em ambientes de sol, mas não nas de sombra, indicando uma não influência das GAs na alocação diferencial de biomassa nas plantas nessa condição. Em B<sub>IR</sub> as plantas tiveram uma redução da RMF com aumento nos níveis de GAs, seja isoladamente pela aplicação de GA<sub>3</sub> em diferentes doses ou ainda sob interferência do PBZ nos tratamentos GA10P e GA100P. Todavia, chama-se atenção que o aumento progressivo em RMC (Figura 4C) em resposta aos níveis de GAs aconteceu tanto em ambientes de sol e quanto de sombra (Figura 4C).

Parâmetros fisiológicos como as taxas de crescimento absoluto (TCA) e relativo (TCR) para altura do caule e MS<sub>T</sub> foram investigados de modo a verificar a *performance* das plantas quanto ao incremento de luz e alterações do metabolismo de GAs (Figura 5). As plantas aumentaram em 42,4% e 36,7% para GA10 e GA100 a TCA do caule, seguido de forte redução de 90,3% para PBZ em plantas A<sub>IR</sub>, em relação ao controle aos 20 dias após início dos tratamentos. Ainda, aumentos mais expressivos na ordem de 142,3% e 272,1% para GA10 e GA100, seguido de similar forte redução em 83,6% para PBZ em B<sub>IR</sub>, em relação ao controle aos 20 dias após aplicação dos tratamentos. Não obstante, valores intermediários de TCA para GA10P e GA100P tanto em ambientes de sol quanto de sombra foram quantificados (Figura 5B). Assim como TCA, o padrão de crescimento expresso pela TCR indicou aumento de forma linear, porém com redução das diferenças de magnitude entre A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (Figuras 5A e 5C).

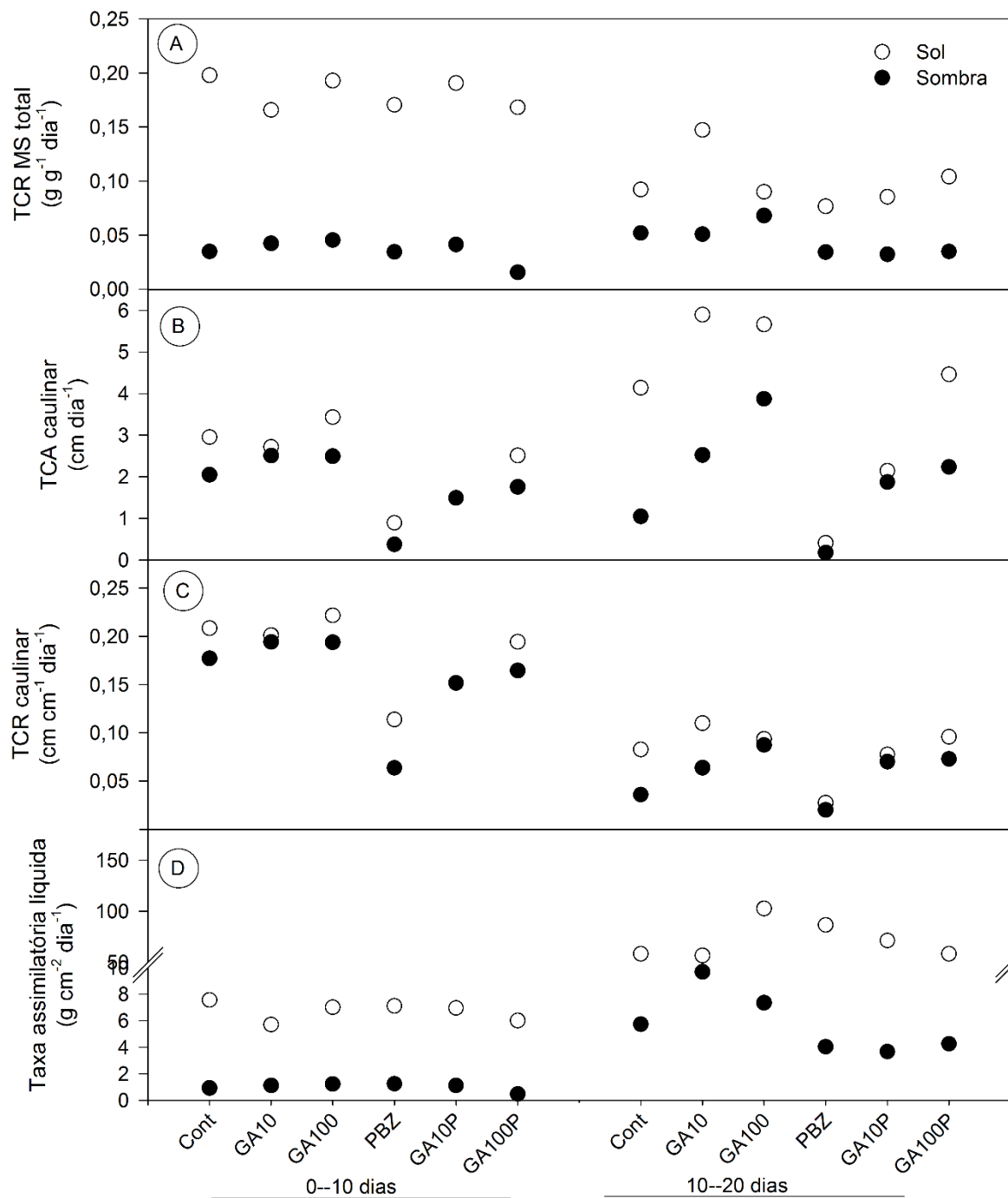
De modo a quantificar a eficiência do acúmulo de biomassa ao longo do tempo em relação à área foliar, calculou a taxa assimilatória líquida (TAL) que está fortemente

relacionada à fotossíntese líquida dentro de um intervalo de tempo, sendo considerada a “média” do período (Figura 5D). As plantas tratadas com maiores doses de GA<sub>3</sub> (GA100), em A<sub>IR</sub>, tiveram maiores taxas globais em relação ao Cont, GA10, PBZ ou nos tratamentos que simularam a reversão do fenótipo proporcionado pelo PBZ (GA10P e GA100P). Plantas tratadas apenas com PBZ em B<sub>IR</sub> apresentou redução dos valores de TAL, porém para GA10 e GA100 houve incremento das taxas (Figura 5D). Desse modo, ressalta-se o aumento da TAL desencadeado pelo aumento dos níveis endógenos de GAs nas plantas. Assim sendo, as alterações promovidas pelas GAs proporcionam a uma maior eficiência fotossintética das plantas cultivadas em condições de restrição de luz para a fotossíntese (dados não mostrados). Evidencia-se que a resposta da interceptação de luz pelas plantas (Figura 6) seguiu os padrões verificados em relação ao comprimento do caule e dos entrenós (Figuras 3B e 3C) no qual se observou maiores valores quando comparado os níveis de GA<sub>3</sub> em A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>.

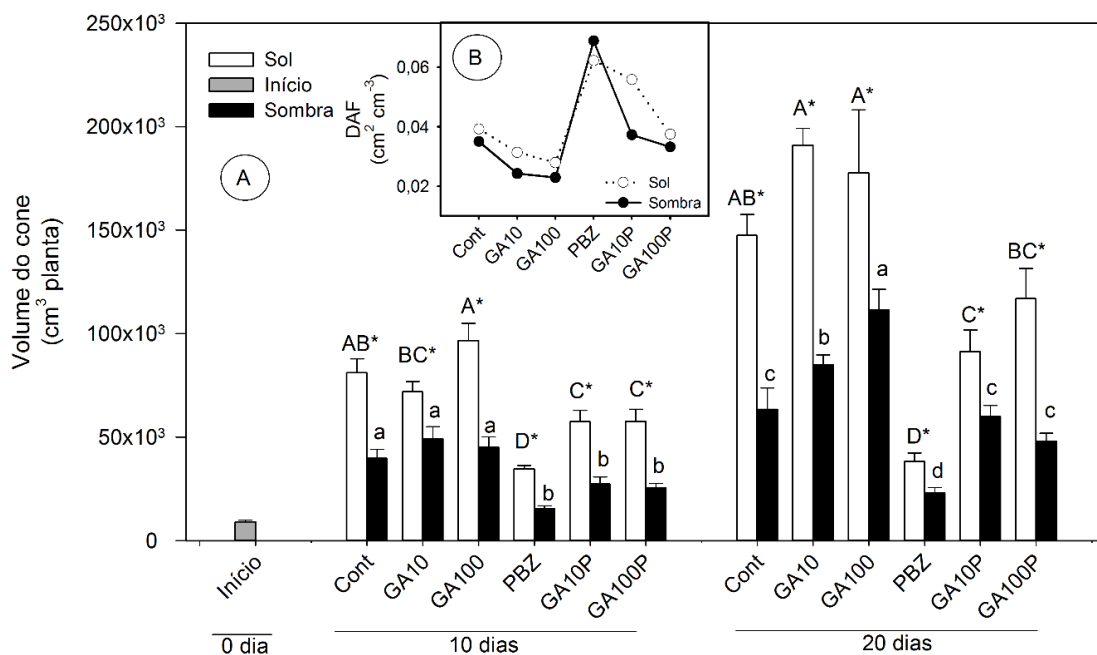
A densidade de área foliar (DAF) (Figura 6B) reduziu com aumento dos níveis endógenos de GAs, embora tenham sido observados valores levemente inferiores para as plantas de sombra. Essas respostas sugerem uma possível influência do arranjo tridimensional da folhagem promovida principalmente pelo maior comprimento dos entrenós possa ser um componente importante na interceptação de total da luz e ganho de MS total da planta que, por sua vez interfere diretamente na TAL (Figura 5D).



**Figura 4** – Razões de área foliar total da planta (A); massa foliar (B); massa caulinar (C); massa radicular (D) e área foliar específica (E), em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.



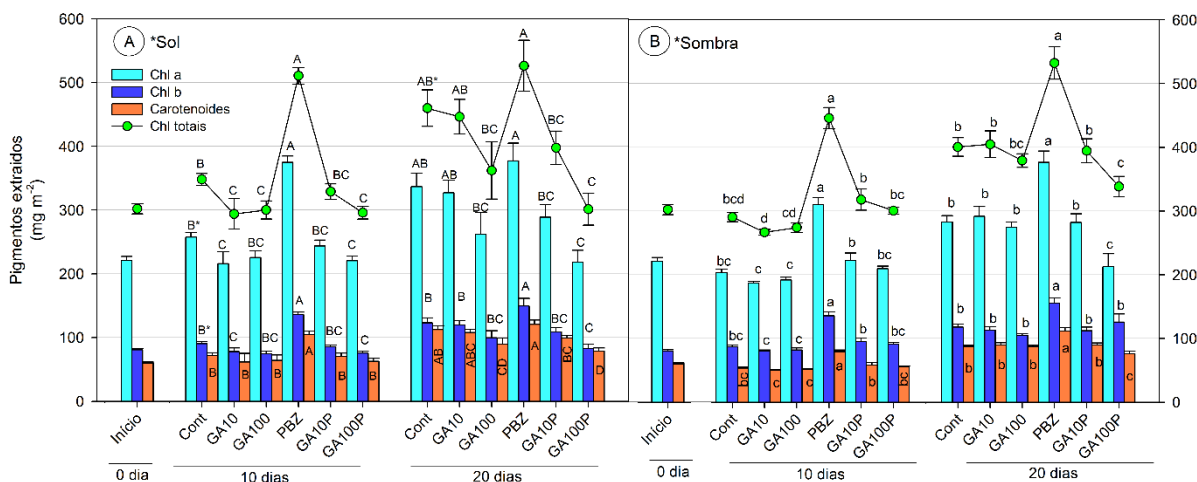
**Figura 5** – Taxa de crescimento relativo (TCR) total da planta (A); crescimento absoluto (TCA) caulinar (B); crescimento relativo caulinar (C) e taxa assimilatória líquida em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6.



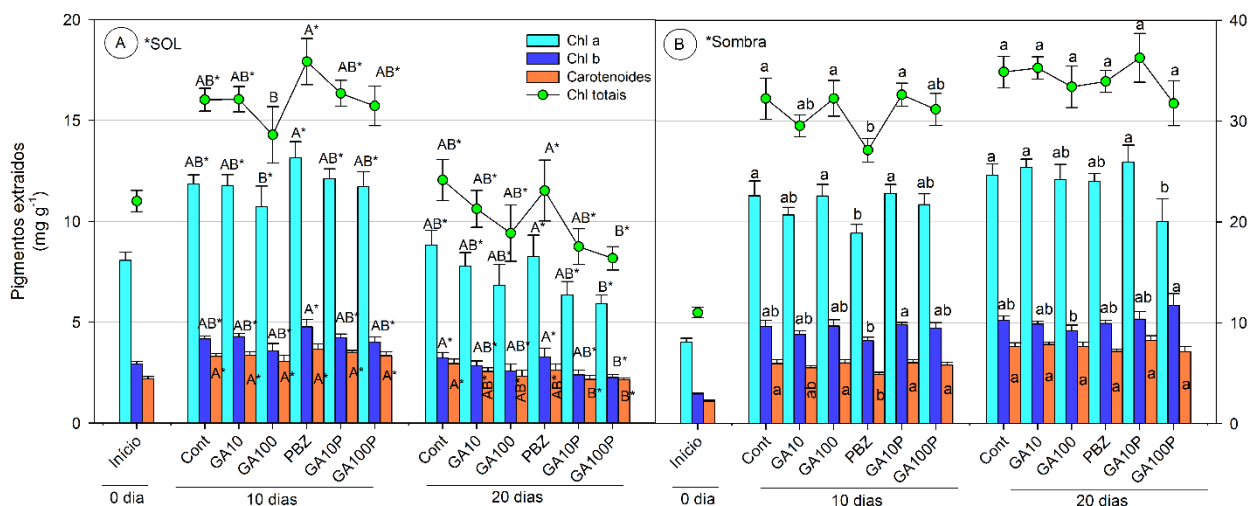
**Figura 6** – Volume do cone (A) e densidade de área foliar (DAF) (B) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

#### 4.2. Análises dos pigmentos

O aumento dos níveis endógenos de GAs via aplicação direta de GA<sub>3</sub> ou a redução via aplicação de PBZ ou mesmo simulando uma capacidade de reversão do fenótipo via aplicação conjunta do inibidor da biossíntese de GAs e aplicação direta do hormônio promoveu alterações dos teores foliares de clorofila *a* (Chl<sub>a</sub>), *b* (Chl<sub>b</sub>) e totais (Chl<sub>a+b</sub>) ou carotenoides (Car) expressos em unidade de área (Figura 7) e, de modo menos intenso, por unidade de massa (Figura 8) em ambientes de sol (Figuras 7A e 8A) e sombra (Figuras 7B e 8B).



**Figura 7** – Pigmentos foliares: clorofila *a*, *b*, totais (*a+b*) e carotenoides (carotenos e xantofilas) expressos por unidade de área em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de sol (A) e sombreado (B) ao 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias após aplicação dos tratamentos. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.



**Figura 8** – Pigmentos foliares: clorofila *a*, *b*, totais (*a*+*b*) e carotenoides (carotenos e xantofilas) expressos por unidade de massa em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de sol (A) e sombreado (B) ao 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias após aplicação dos tratamentos. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

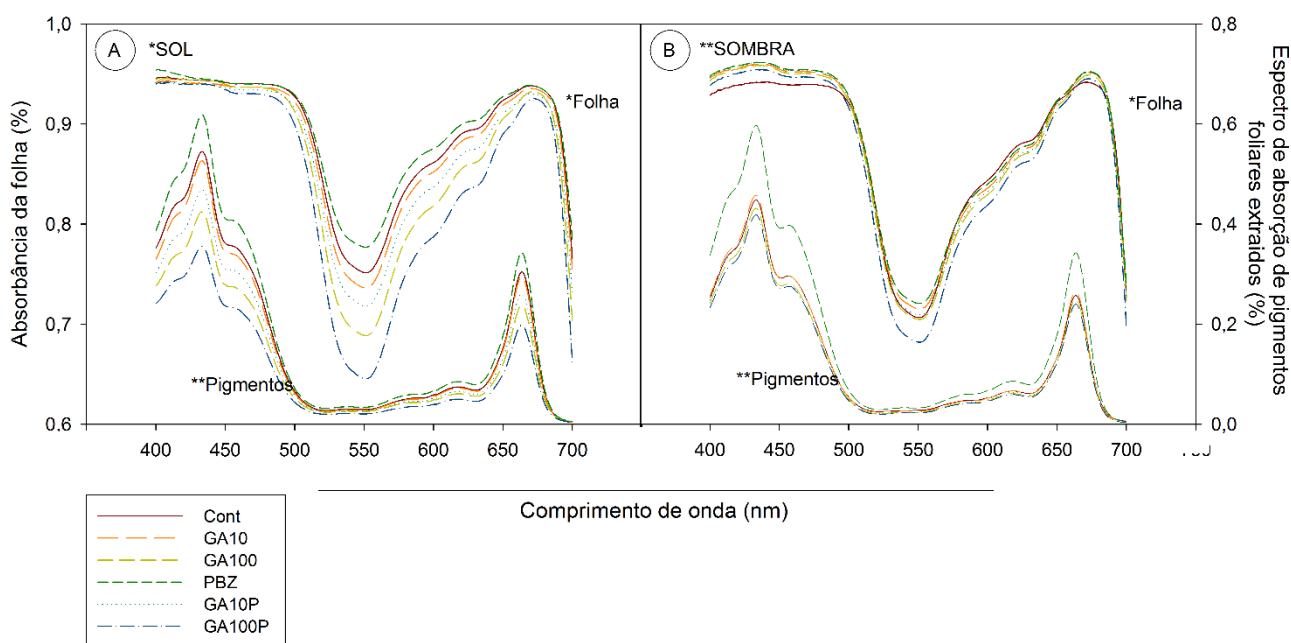
Os teores de pigmentos extraídos e expressos por unidade de área (Figura 7) foram maiores em plantas submetidas ao tratamento PBZ, seguido por redução dos teores de Chl<sub>*a*</sub>, Chl<sub>*b*</sub>, Chl<sub>*a+b*</sub> e Car em plantas tratadas com GAs de maneira dependente de dose de GA<sub>3</sub>. Maiores reduções foram encontradas quando aplicados GA<sub>3</sub>+PBZ (GA10P e GA100P) (Figura 7) tanto em plantas de sol quanto de sombra. Aumentos nos teores de Chl<sub>*a+b*</sub> na ordem de 14,5% para PBZ e reduções de 21% e 34% nos tratamentos GA100 e GA100P foram encontrados em plantas de sol, respectivamente (Figura 7A). De forma semelhante houve aumento de 33,1% em plantas com PBZ e reduções de 5,2% e 15,5% foram verificados nos tratamentos GA100 e GA100P em plantas de sombra (Figura 7B). Por outro lado, quando comparado os teores de Chl<sub>*a*</sub>, Chl<sub>*b*</sub>, Chl<sub>*a+b*</sub> e Car entre sol e sombra não foram observadas reduções significativas (*p*>0,05) (Figura 7A e 7B).

Pigmentos expressos por unidade de massa (Figura 8) apresentaram comportamento diferencial (*p*≤0,05) conforme o tratamento aplicado especialmente quando comparado ambientes A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. De modo geral, os tratamentos nos quais foram aplicados GA<sub>3</sub> tiveram reduções nos teores de clorofilas totais sendo os valores mais intensos para dose de 100μM, especialmente para plantas A<sub>IR</sub>, mas não para as B<sub>IR</sub>. Incrementos da ordem de 50% para Chl<sub>*a*</sub>, Chl<sub>*b*</sub>, Chl<sub>*a+b*</sub> e Car foram verificados (Figura 8) para o tratamento PBZ. Todavia foi observado contrastes para os componentes entre sol e sombra (Figuras 8A e 8B). Observou-se redução em Chl<sub>*a+b*</sub> para GA100 em relação ao controle e ainda fortes reduções em GA100P para A<sub>IR</sub> (Figura 8A). Fortes aumentos na concentração de clorofilas e carotenoides expressa por unidade de área (Figura 7) encontrada nas folhas das plantas tratadas apenas com PBZ não se

traduziram ( $p>0,05$ ) em alterações significativas quando expressas por unidade de massa (Figura 8). Por outro lado, plantas de sombra apresentaram similares teores em pigmentos por massa (Figura 8B). Salienta-se que a razão  $Chl_a/Chl_b$  não sofreram alterações diferenciais, exceto por uma redução indistinta dessa razão para plantas de sombra em relação às de sol (dados não mostrados).

#### 4.3. Espectro de absorbância da folha e pigmentos

O espectro de absorbância da folha (*in vivo*) e dos pigmentos (*in vitro*) foram obtidos em plantas de ambientes de sol e sombra e com alterações do conteúdo de GAs (Figura 9). Ocorreram alterações no espectro de absorção da folha e dos pigmentos (Figura 9) em resposta tanto à luz quanto aos níveis de GAs.



**Figura 9** – Curva do espectro de absorbância da folha (*in vivo*) e dos pigmentos (*in vitro*) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de  $GA_3$  e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de sol (A) e sombra (B). Siglas conforme Figura 2.  $n=6$ .

Tendo em vista as alterações observadas na morfologia das folhas (Figura 1) e componentes relacionados à AFE (Figura 4E), TAL (Figura 5D) e Chl por área e massa (Figuras 7 e 8) decidiu-se quantificar a absorbância da folha *in vivo* e espectro de absorção dos pigmentos extraídos em acetona. Evidenciou-se maior absorbância tanto dos pigmentos quando da própria folha nos tratamentos PBZ e menor absorbância em plantas com  $GA_3$  (GA10 e GA100) nos tratamentos em  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$  (Figura 9). Surpreendentemente, a aplicação

de GA<sub>3</sub> em plantas com PBZ a promoveu a menor absorvância em 550 nm tanto das folhas quanto dos pigmentos nos seus picos característicos (Figura 9, Tabela 1).

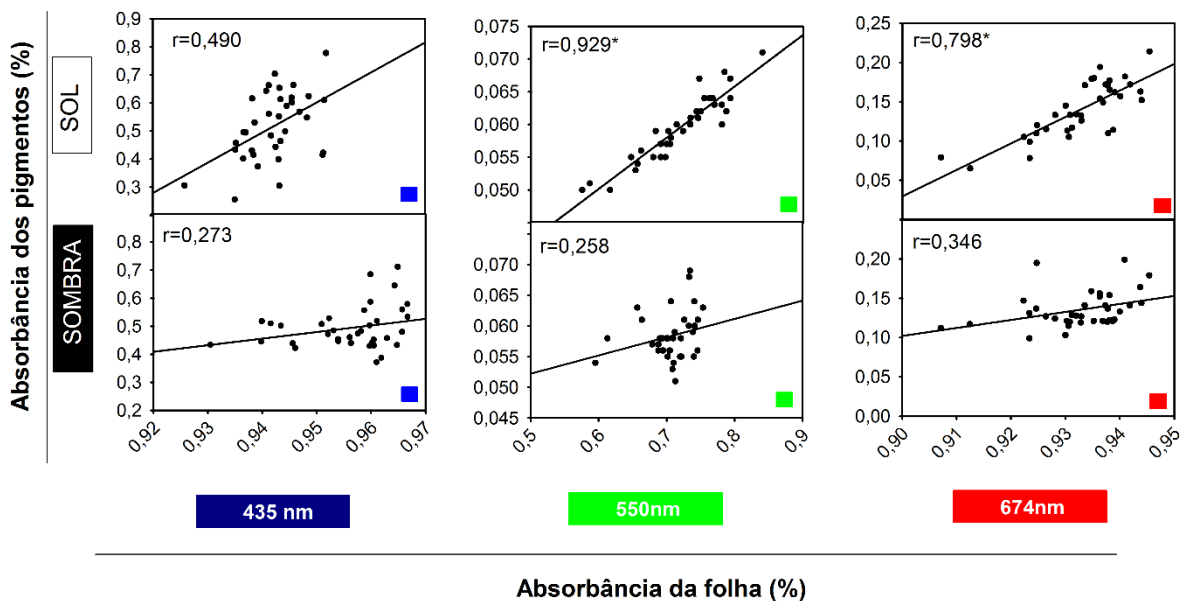
Em respostas às curvas de absorvância da folha e dos pigmentos (Figura 9), verificaram-se os pontos característicos de absorvância do azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) (Figuras 9 e 10). Evidenciou-se que alterações foram encontradas entre plantas de sol e sombra em 435nm e 674nm, com exceção do controle, enquanto em 550nm, apenas em Cont e PAC apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Absorvância da folha dos comprimentos de onda no azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (para mais detalhes das siglas veja na Figura 2). Dados em negrito indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste *t* de Student entre plantas de sol e sombra. Mais detalhes das siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

Treatamento	435 nm			550 nm			674 nm		
Sol	Cont	0,943849 ± 0,001647	A	0,751706 ± 0,014442	AB	0,937567 ± 0,001986	A		
	GA10	0,940751 ± 0,001664	A	0,736299 ± 0,011528	ABC	0,934765 ± 0,002064	A		
	GA100	0,944195 ± 0,002188	A	0,688757 ± 0,026029	CD	0,931902 ± 0,004150	AB		
	PAC	0,945002 ± 0,002542	A	0,777111 ± 0,018880	A	0,937638 ± 0,003081	A		
	GA10P	0,939509 ± 0,001304	A	0,718053 ± 0,016681	BC	0,929490 ± 0,001623	AB		
	GA100P	0,939968 ± 0,003397	A	0,645637 ± 0,018510	D	0,925000 ± 0,004382	B		
Sombra	Cont	0,941365 ± 0,002783	a	<b>0,706466 ± 0,013101</b>	ab	0,941232 ± 0,002420	a		
	GA10	<b>0,959584 ± 0,001445</b>	a	0,715173 ± 0,008445	abc	<b>0,951336 ± 0,001863</b>	a		
	GA100	<b>0,958320 ± 0,001969</b>	a	0,704697 ± 0,008670	cd	<b>0,948749 ± 0,002347</b>	ab		
	PAC	<b>0,961324 ± 0,002127</b>	a	<b>0,720602 ± 0,012721</b>	a	<b>0,952197 ± 0,003012</b>	a		
	GA10P	<b>0,961386 ± 0,001367</b>	a	0,709114 ± 0,007464	bc	<b>0,951225 ± 0,001583</b>	ab		
	GA100P	<b>0,954006 ± 0,003470</b>	a	0,681859 ± 0,025322	d	<b>0,944978 ± 0,004390</b>	b		

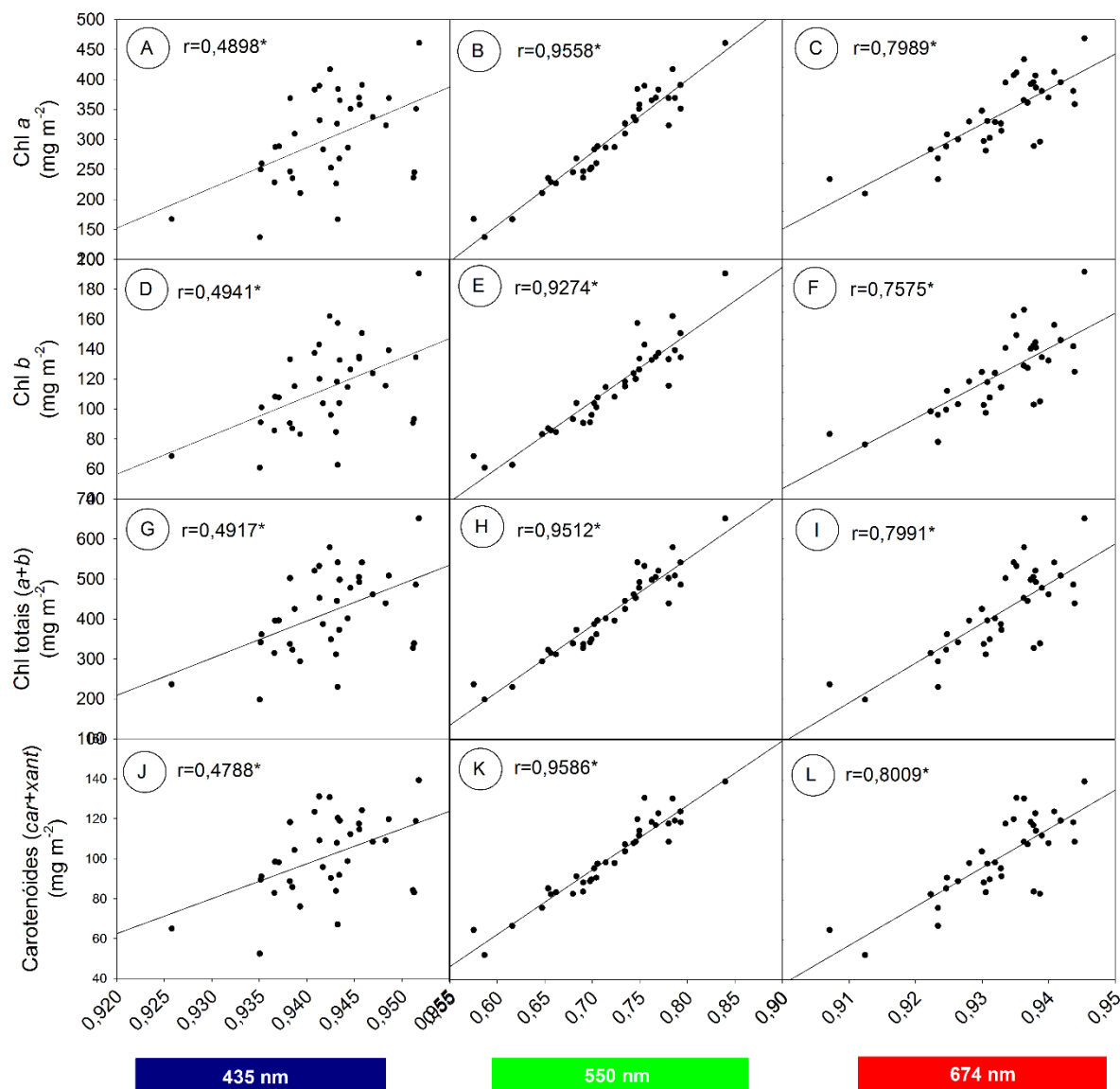
Considerando a curva de absorvância da folha *in vivo* e dos pigmentos extraídos (*in vitro*, sem distinção dos pigmentos) (Figura 9) utilizou-se a correlação de *Pearson* para medir o grau de associação entre estas variáveis. Em 550nm e 674nm a alta correlação explicaria as maiores absorvâncias da folha em resposta ao conteúdo total de clorofilas, mas não em 435nm (Figura 10) em A<sub>IR</sub> que possivelmente possa ter influência dos carotenoides que absorvem bastante nessa faixa espectral. Além disso, as correlações entre a absorvância da folha (*in vivo*) e dos pigmentos extraídos (expressos por unidade de área – *in vitro*) não explicariam o incremento da absorvância em PBZ ou a diminuição em GA100P (Figura 10) no verde para B<sub>IR</sub> indicando que algum componente estrutural poderia afetar a absorvância foliar sem grandes alterações nos teores de pigmentos nessa condição.





**Figura 10**– Correlação linear entre absorvância da folha (*in vivo*) com a absorvância dos pigmentos extraídos em acetona (*in vitro*; sem distinção) nos comprimentos de onda do azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. \* indica correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste F. Mais detalhes das siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=36.

Em resposta aos dados correlacionados de absorvância da folha e pigmentos fotossintéticos em algumas bandas espectrais (Figuras 9 e 10), objetivou-se separar o grau de associação de cada um dos pigmentos associados à fotossíntese (Chl<sub>a</sub>, Chl<sub>b</sub>, Chl<sub>(a+b)</sub> e Car) (Figuras 11). Demonstra-se que uma forte correlação ( $r$ ) com valor de  $r$  acima de 0,92 ( $p \leq 0,05$ ) em 550nm e  $r$  acima de 0,75 ( $p \leq 0,05$ ) em 674nm em plantas cultivadas em ambientes de sol e para os pigmentos Chl<sub>a</sub>, Chl<sub>b</sub>, Chl<sub>(a+b)</sub> e Car em relação as plantas cultivadas em ambientes de sol (Figura 11). Por outro lado, em plantas de sombra uma fraca correlação foi evidenciada (dados não mostrados) em todas as combinações avaliadas. Adicionalmente, a absorvância da folha difere do padrão de absorção dos pigmentos solúveis em acetona e não reflete apenas ao conteúdo absoluto de pigmentos fotossintéticos, mas também aos componentes anatômicos estruturais tanto das folhas, como possivelmente dos cloroplastos e tilacoides onde os pigmentos fotossintéticos estão localizados.



**Figura 11** – Correlação linear entre absorvância da folha (*in vivo*) com a e absorvância dos pigmentos extraídos em acetona (*in vitro*; com distinção entre os pigmentos; (A-C) Clorofila *a*, (D-F) Clorofila *b*, (G-I) Clorofila *a+b*, (J-L) Carotenóides totais) nos comprimentos de onda do azul (435nm), verde (550nm) e vermelho (674nm) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações no ambiente de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. \* indica correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste F. Mais detalhes das siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=36.

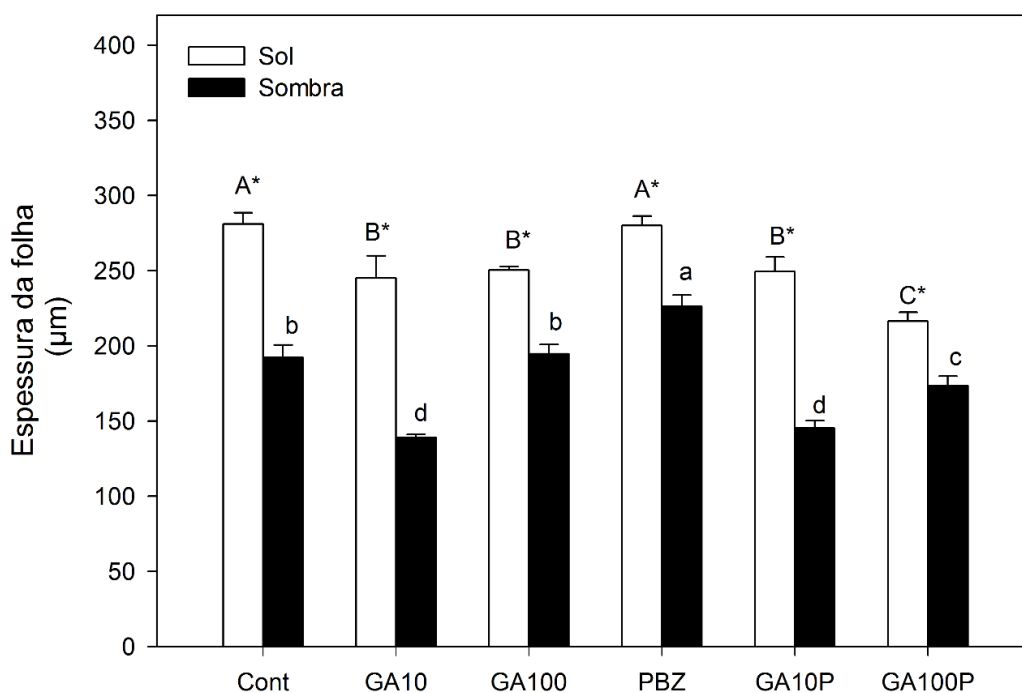
#### 4.4. Análises anatômicas

Em função das alterações no acúmulo de MS, nos parâmetros de crescimento, nos pigmentos foliares, buscou-se analisar algumas características morfo-anatômicas da folha e do caule em resposta aos tratamentos aplicados a fim de elucidar questões referentes à alocação de C das plantas e efeitos específicos das GAs sobre a anatomia e diferenciação celular em resposta a variações de luz e do conteúdo de GAs.

#### 4.4.1. Microscopia de luz da folha

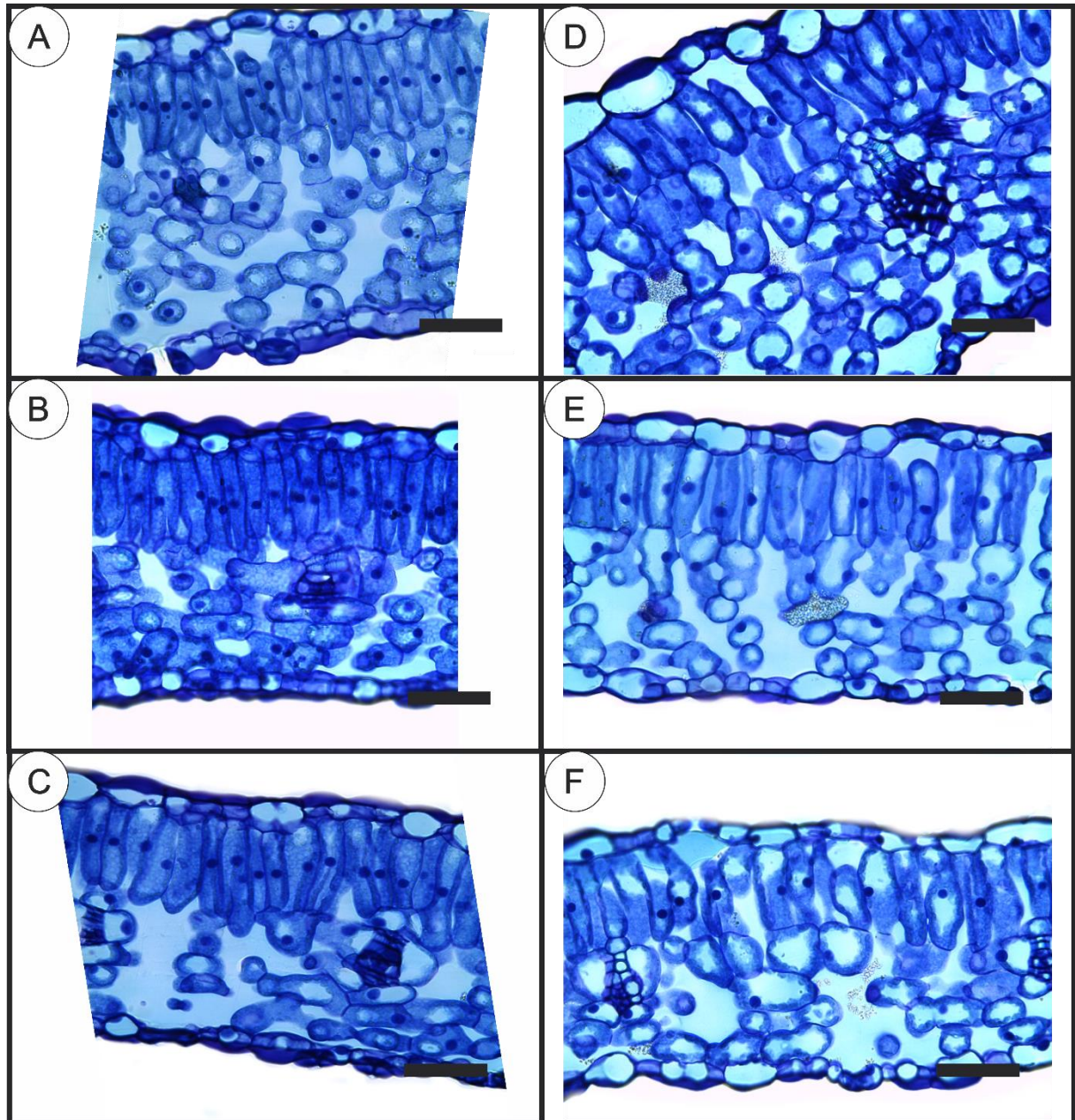
Foram observadas variações na espessura da folha entre plantas cultivadas em A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> e também em função dos tratamentos com GA<sub>3</sub> e/ou PBZ (Figuras 12, 13 e 14). Em A<sub>IR</sub> observou-se espessura semelhante da folha entre Cont e PBZ (Figuras 12, 13A e 13D), enquanto os tratamentos GA10 e GA100 reduziram na ordem de 12,8% (Figuras 12, 13B e 13C) e maiores reduções em torno de 29,6% para GA100P (Figuras 12, 13E, 13F), respectivamente. Adicionalmente, em condições de baixa irradiância, o tratamento PBZ aumentou-se em 17,7% a espessura da folha em relação ao controle (Figuras 12, 14D), enquanto em GA10 apresentou-se reduções na ordem de 28,9% (Figuras 12 e 14B), mas não para GA100 (Figuras 12 e 14C), ambos em relação ao respectivo controle (Figura 14). Paralelamente GA10P assemelhou-se com GA10 (Figuras 12, 14B e 14E) e GA100 com o tratamento GA100P (Figura 12, 14C e 14F). Além disso, verificaram-se diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os ambientes comparando tratamentos similares (Figuras 12, 13 e 14) sendo as folhas de sombra sempre mais finas que as de maior irradiância.

Nas plantas tratadas com PBZ e suplementadas com GA<sub>3</sub> houve redução da espessura da folha independentemente do nível de irradiação (Figuras 12, 13 e 14). Desse modo, evidencia que GA<sub>3</sub> é capaz de reverter plenamente o efeito de PBZ, nesse caso, diminuindo a espessura das folhas.



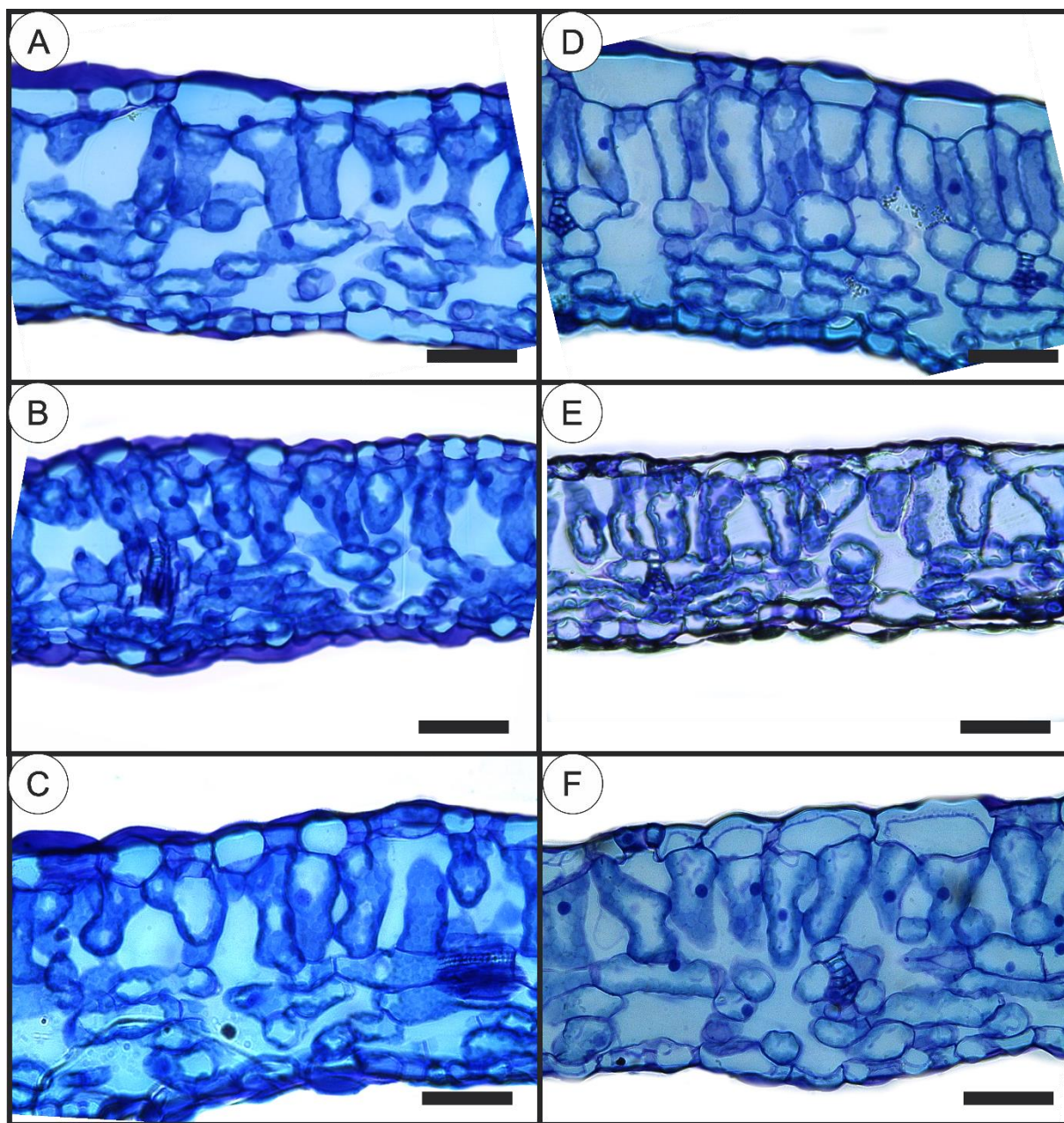
**Figura 12**– Espessura da folha de plantas de tabaco em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=20±SE.

Salienta-se ainda que em análises qualitativas foram observadas nas células do parênquima paliçádico, células justapostas com formato cilíndricas e uniestratificadas nos tratamentos Cont, GA10, GA100, GA10P e GA100P (Figura 13, exceto 13D), porém excepcionalmente no tratamento PBZ evidenciou-se camadas biestratificadas no parênquima paliçádico (Figura 13D) em ambientes de sol (Figura 13).



**Figura 13** – Microscopia de luz da seção transversal de folhas de tabaco cultivadas em  $A_{IR}$  (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de  $GA_3$ : (A) Cont; (B) GA10; (C) GA100; (D) PBZ; (E) GA10P e (F) GA100P aos 20 dias. Siglas conforme Figura 2. Barra = 50µm.

Cabe ressaltar que apesar de não observar camadas biestratificadas em plantas tratadas com PBZ em ambientes de sombra (Figura 14D), observou-se alterações em relação a morfologia celular em todos os tratamentos assim como aumento dos espaços intercelulares (Figuras 14, exceto 14D). Ademais evidenciou alterações morfológicas das células do parênquima paliçádico que apresentaram-se em formato “triangular” e com a maior face de exposição voltada para o lado adaxial da folha (Figura 14).

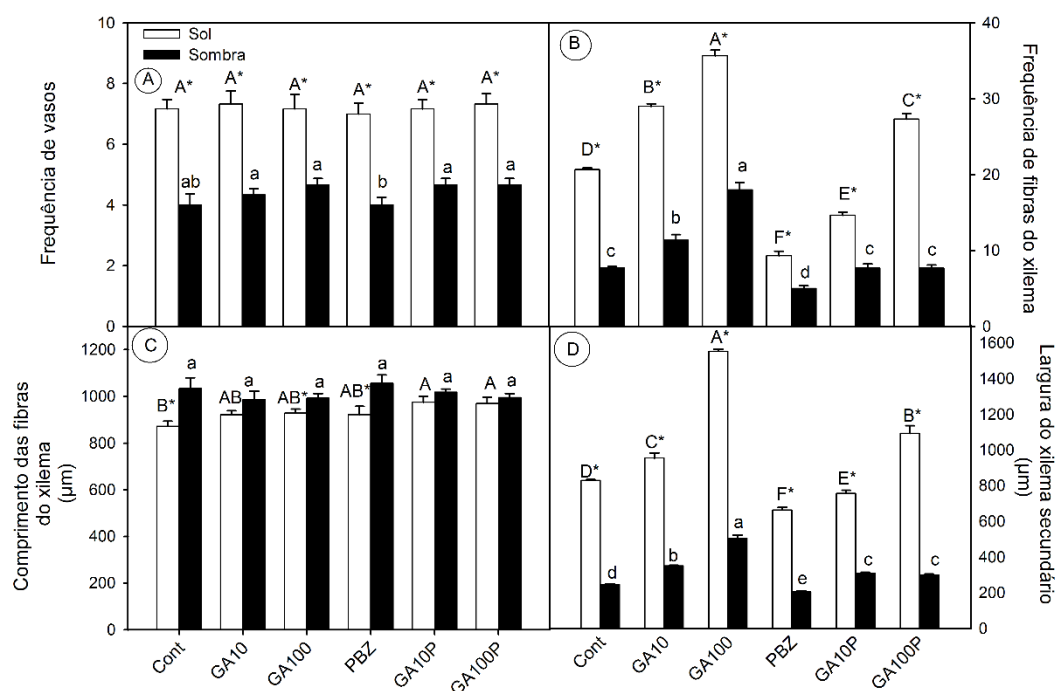


**Figura 14** – Microscopia de luz da seção transversal de folhas de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: (A) Cont; (B) GA10; (C) GA100; (D) PBZ; (E) GA10P e (F) GA100P aos 20 dias. Siglas conforme Figura 2. Barra = 50µm.

#### 4.4.2. Microscopia de luz do caule

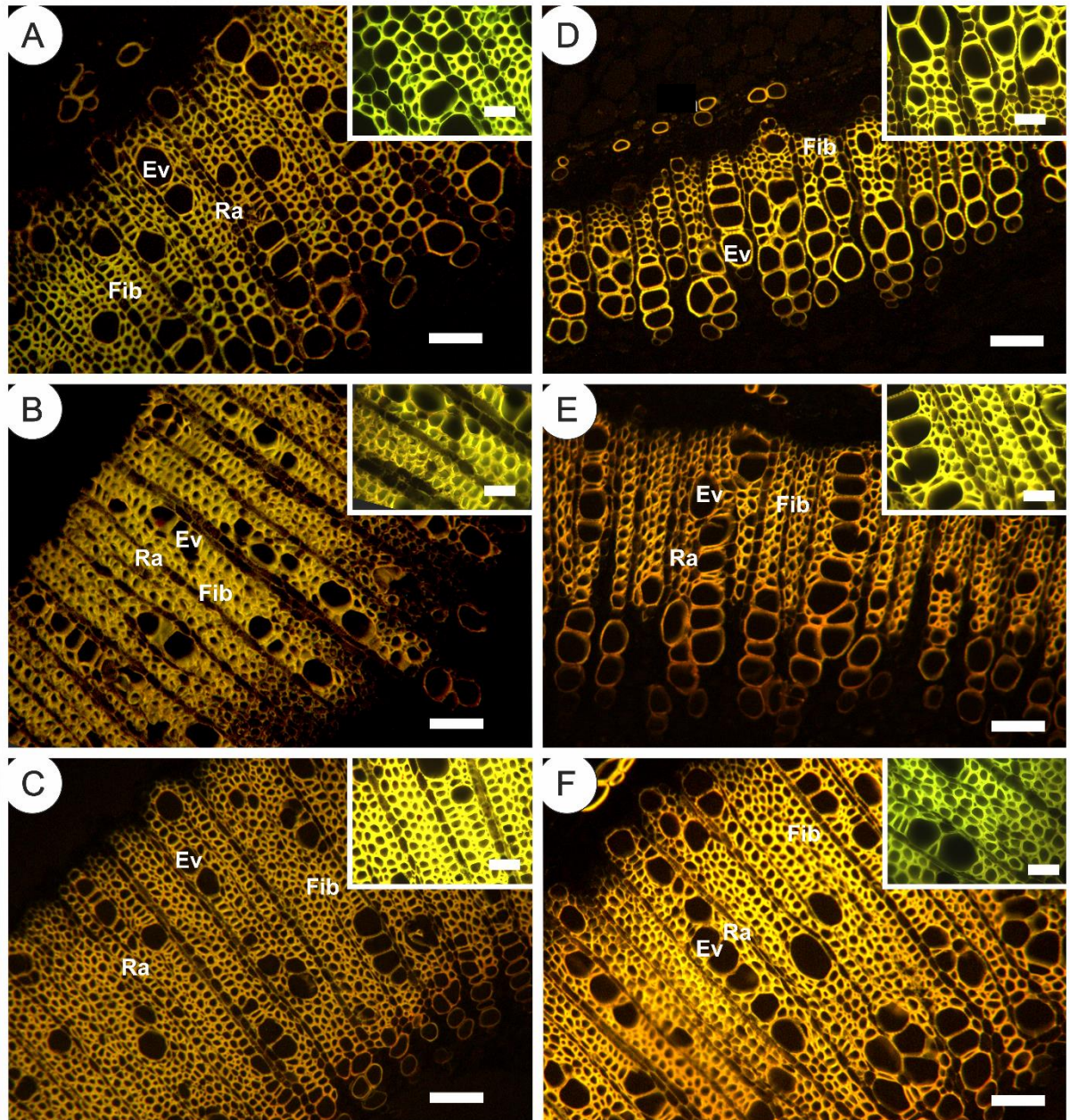
Tanto em plantas tratadas com GA<sub>3</sub> e/ou PBZ em ambientes de sol ou sombra apresentaram alterações anatômicas em especial no número de fibras e espessura das fibras do xilema secundário (FX) quando comparadas ao controle (Figuras 15-21). O número de elementos de vaso e comprimento das fibras não sofreram alterações entre os tratamentos com GA<sub>3</sub> e/ou PBZ (Figura 15A, 15C, 18 e 21). A aplicação de GA<sub>3</sub> independentemente do nível de luz promoveu intenso aumento no número (>52%) (Fig. 15B, 15D, 16, 17, 19, 20), maior atividade cambial e desenvolvimento de estruturas secundárias, ao passo que a aplicação isolada de PBZ promoveu forte repressão (>37,5%) do desenvolvimento delas, ambos em relação aos controles (Figura 15B, 16D, 18 e 21).

O efeito da espessura do xilema foi maior em GA100 para as plantas cultivadas a pleno sol (>87%) (Figuras 15D, 16C, 17C) quanto do ambiente de sombra (>105%) (Figuras 15D, 19C, 20C), ao passo que as tratadas com PBZ reduziu em 20,1% para A<sub>IR</sub> (Figuras 15D, 16D, 18D) e 16,6% na sombra (Figuras 15D, 19D e 21D) ambos em relação aos respectivos controles (Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21). Adicionalmente, quando as plantas tratadas com PBZ foram suplementadas com GA<sub>3</sub>, a interação GA100P apresentou aumento da espessura das fibras do xilema em 31,9% para as plantas do sol e 22,3% para as de sombra (Figuras 15D, 16-21), em relação ao controle, cujo aumento foi, menor àquele promovido pela aplicação isolada de GA<sub>3</sub> 100μM.

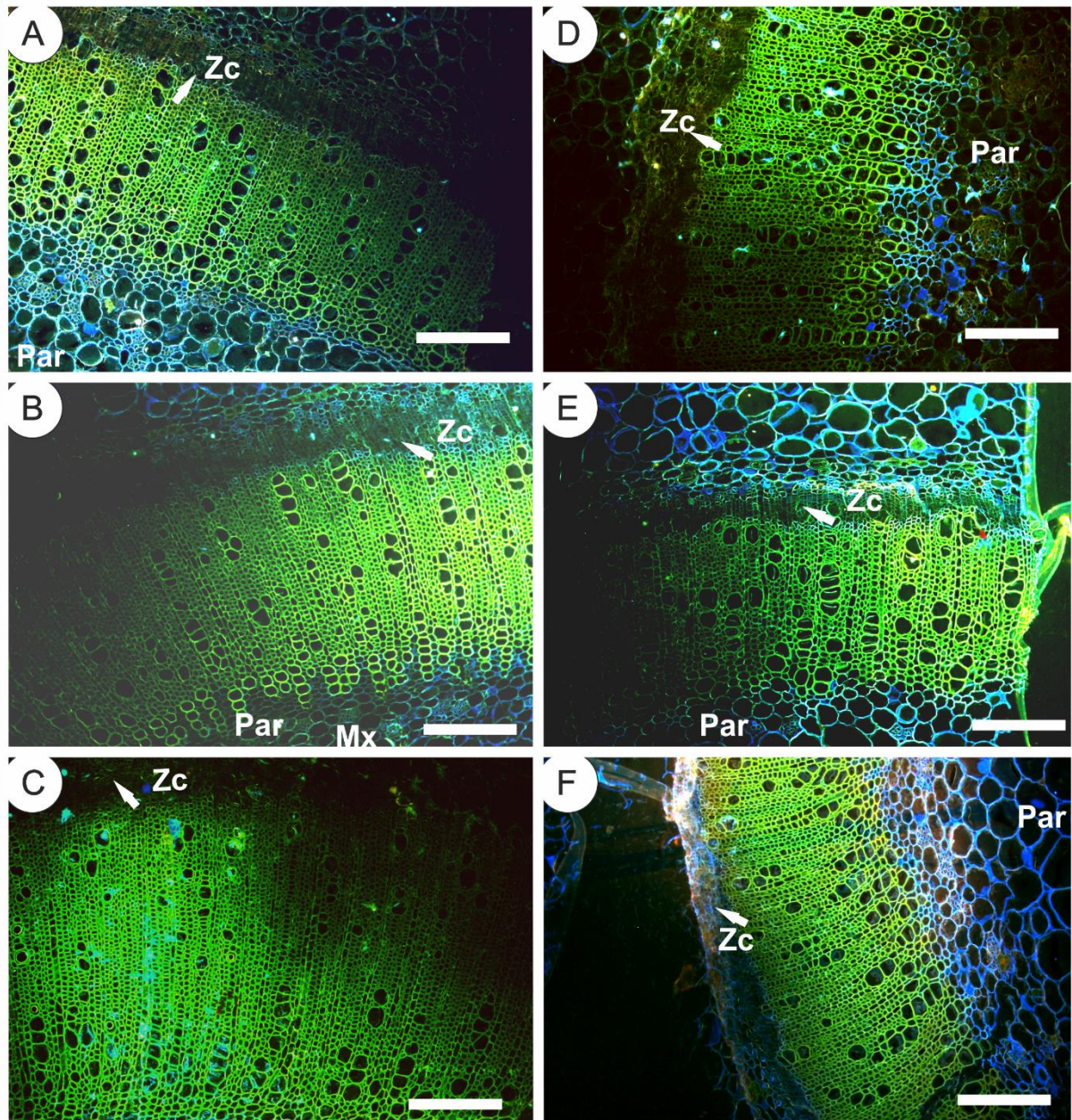


**Figura 15** – Frequência de vasos (A); frequência de fibras do xilema (B); comprimento das fibras do xilema (C); largura do xilema secundário (D) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

Qualitativamente foram visualizadas alterações da coloração entre elementos de vaso e as fibras do xilema em microscopia de fluorescência (Figuras 16 e 19) em plantas cultivadas em ambientes de sol e sombra, porém sem diferenças entre os tecidos parenquimáticos (Figuras 17 e 20).

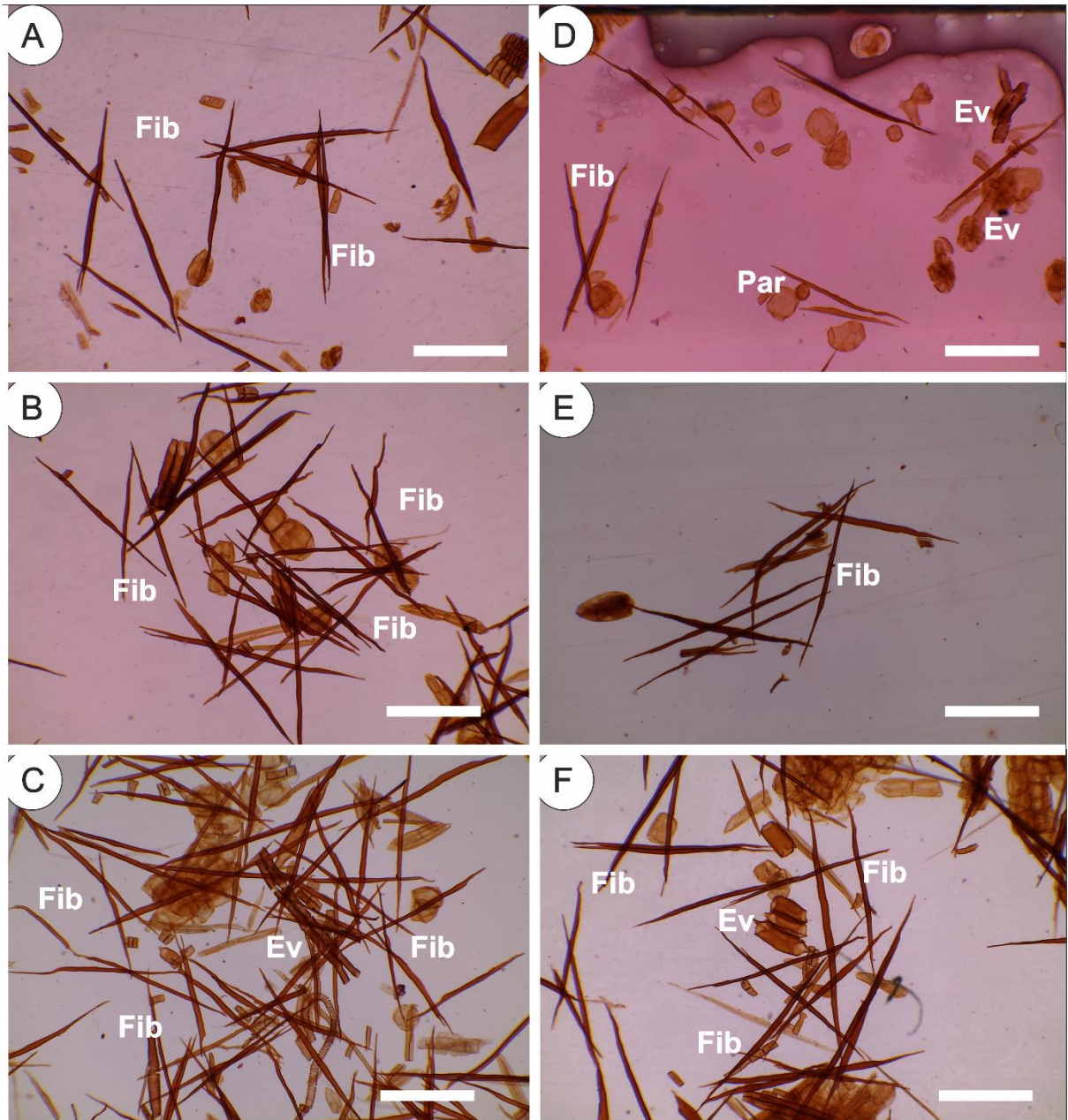


**Figura 16** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em PEG, corado com azul de astra e safranina e analisado em  $\lambda 460\text{nm}$  Barra = 100 $\mu\text{m}$  ou 50  $\mu\text{m}$  (box). Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Ra = Raios do xilema.

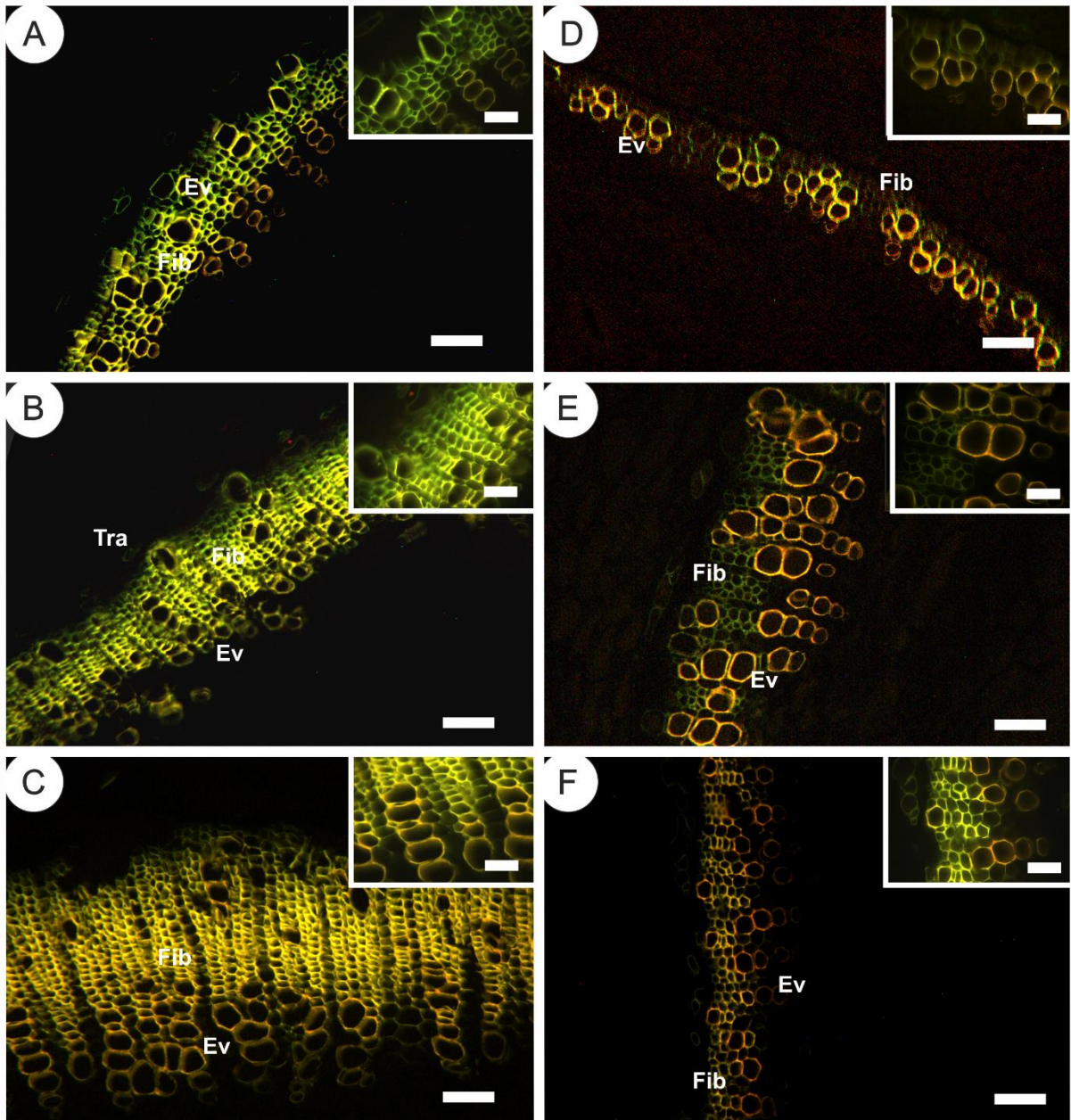


**Figura 17** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em A<sub>IR</sub> (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em historesina, corados com Calcofluor White 28 (0,01%) e Auramina O (0,01%) e analisado em  $\lambda$ 360nm. Barra = 500 $\mu$ m. Zc = Zona cambial; Par = Células parenquimáticas.

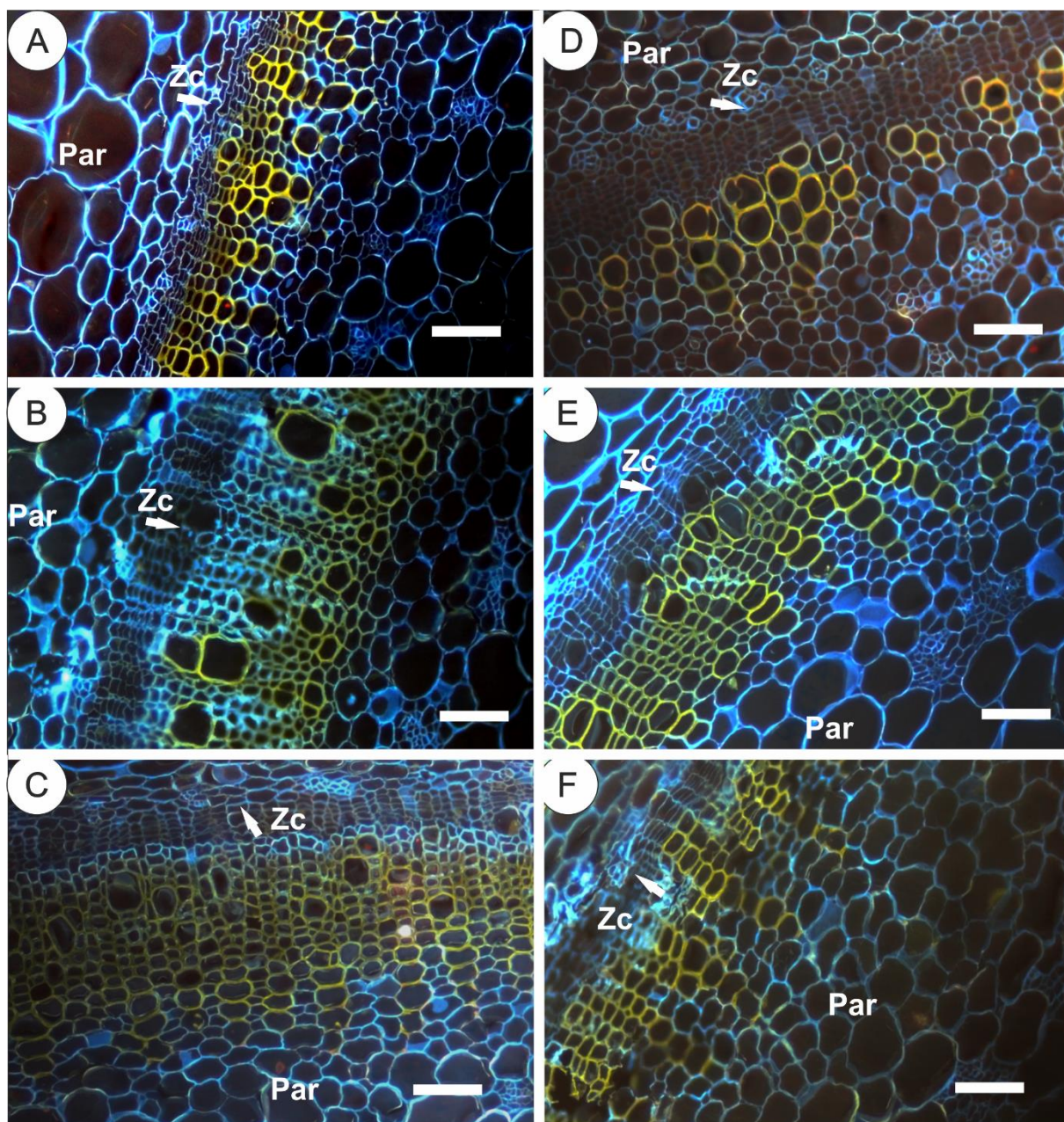




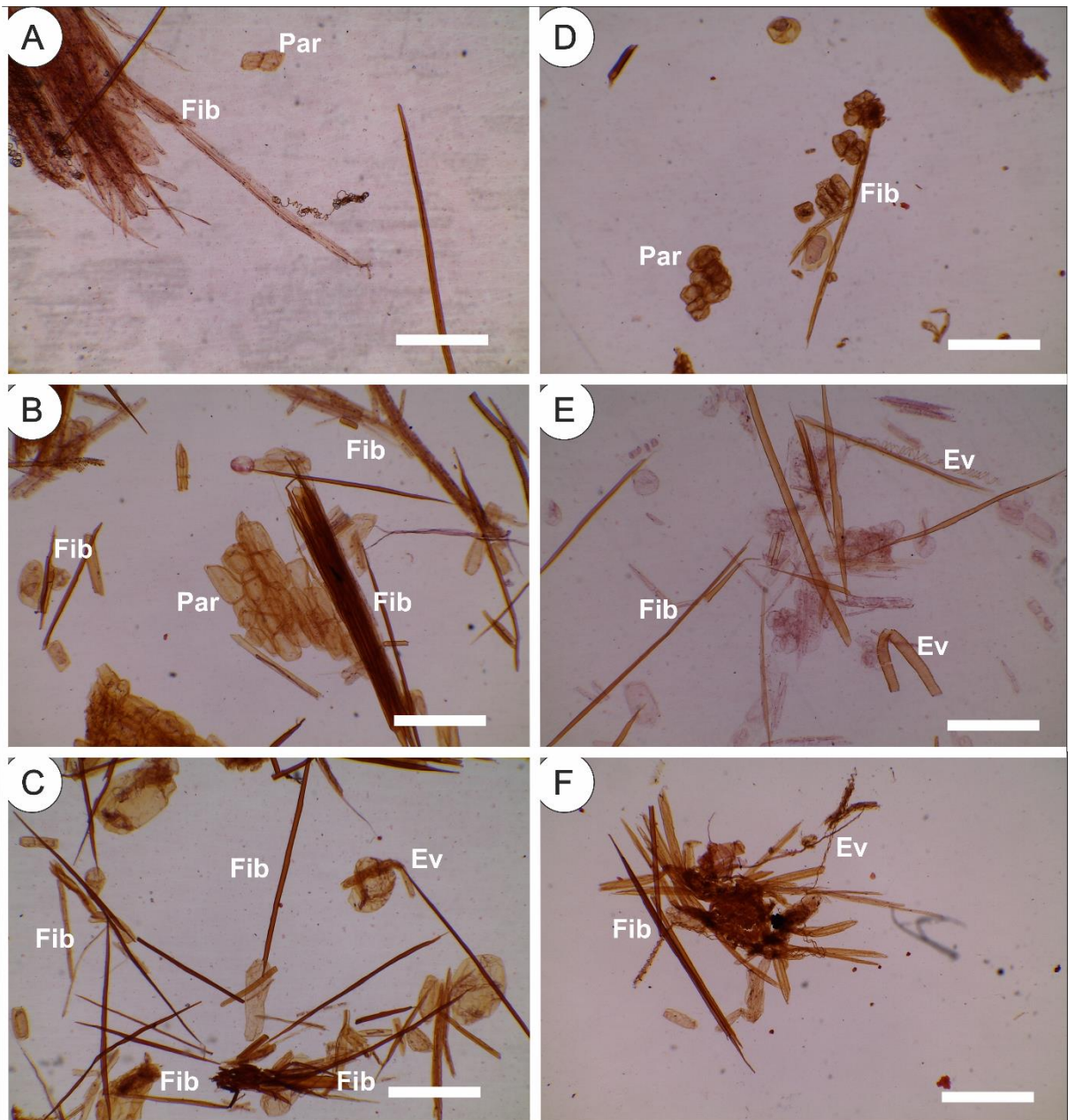
**Figura 18** – Microscopia de luz das fibras maceradas de caules de tabaco cultivadas em  $A_{IR}$  (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de  $GA_3$ : Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Corados com safranina 1%. Barra = 500 $\mu$ m. Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Par = Células parenquimáticas.



**Figura 19** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em PEG, corado com azul de astra e safranina e analisado em  $\lambda 460\text{nm}$  Barra = 100 $\mu\text{m}$  ou 50  $\mu\text{m}$  (box). Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Ra = Raios do xilema.



**Figura 20** – Microscopia de fluorescência da seção transversal de caules de tabaco cultivadas em  $B_{IR}$  (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de  $GA_3$ : Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Material cortados em historesina, corados com Calcofluor White 28 (0,01%) e Auramina O (0,01%) e analisado em  $\lambda 360nm$ . Barra =  $100\mu m$ . Zc = Zona cambial; Par = Células parenquimáticas.



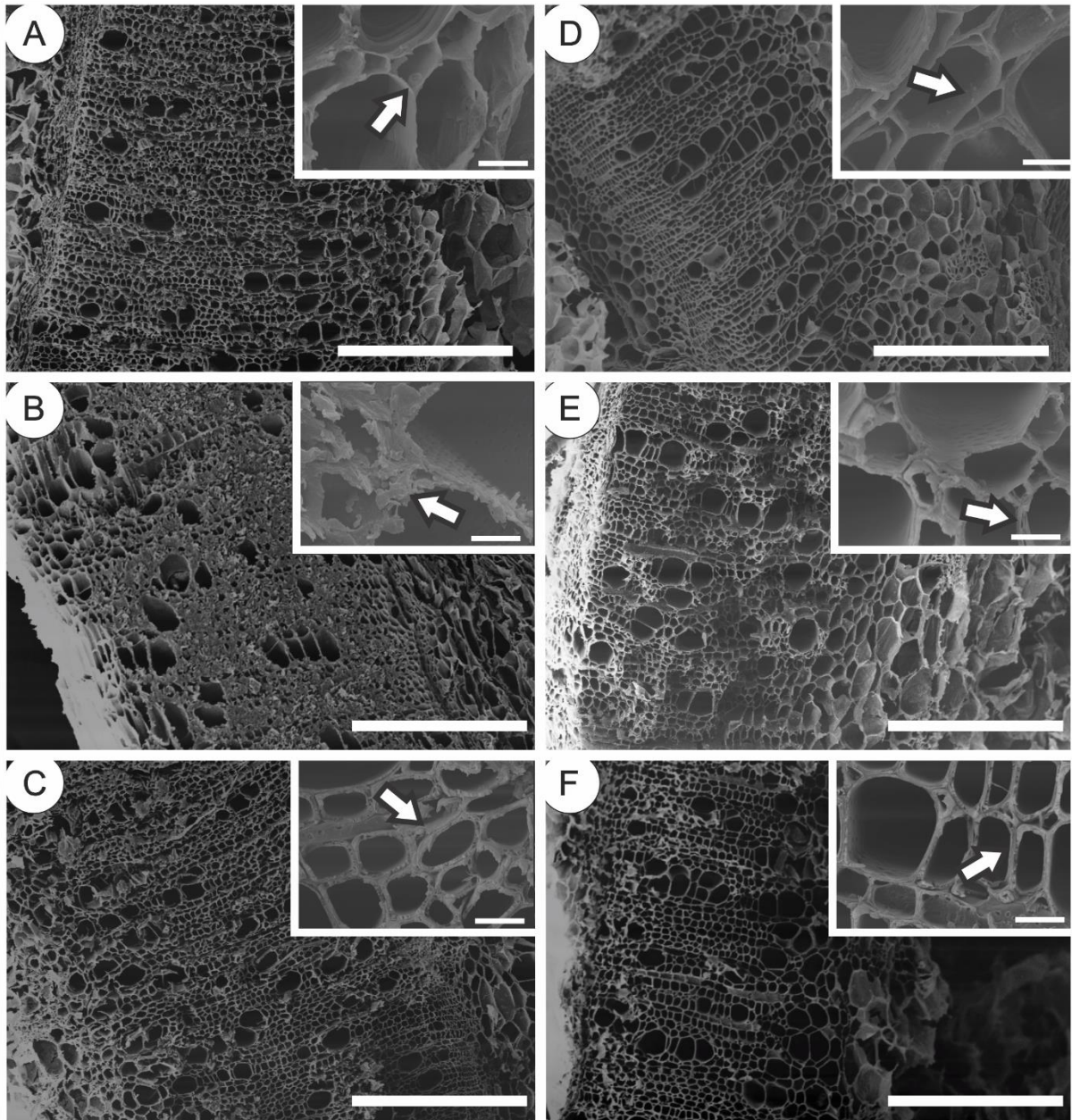
**Figura 21** – Microscopia de luz das fibras maceradas de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Corados com safranina 1%. Barra = 500μm. Ev = Elemento de vaso; Fx = Fibras do xilema; Par = Células parenquimáticas.

Ressalta-se que maior atividade do câmbio foi encontrada em plantas com maiores níveis de GAs, em especial no ambiente sombreado (Figuras 19 e 20). Além disso, o desenvolvimento de estruturas como raios xilemáticos foram evidenciados de caules em crescimento secundário.

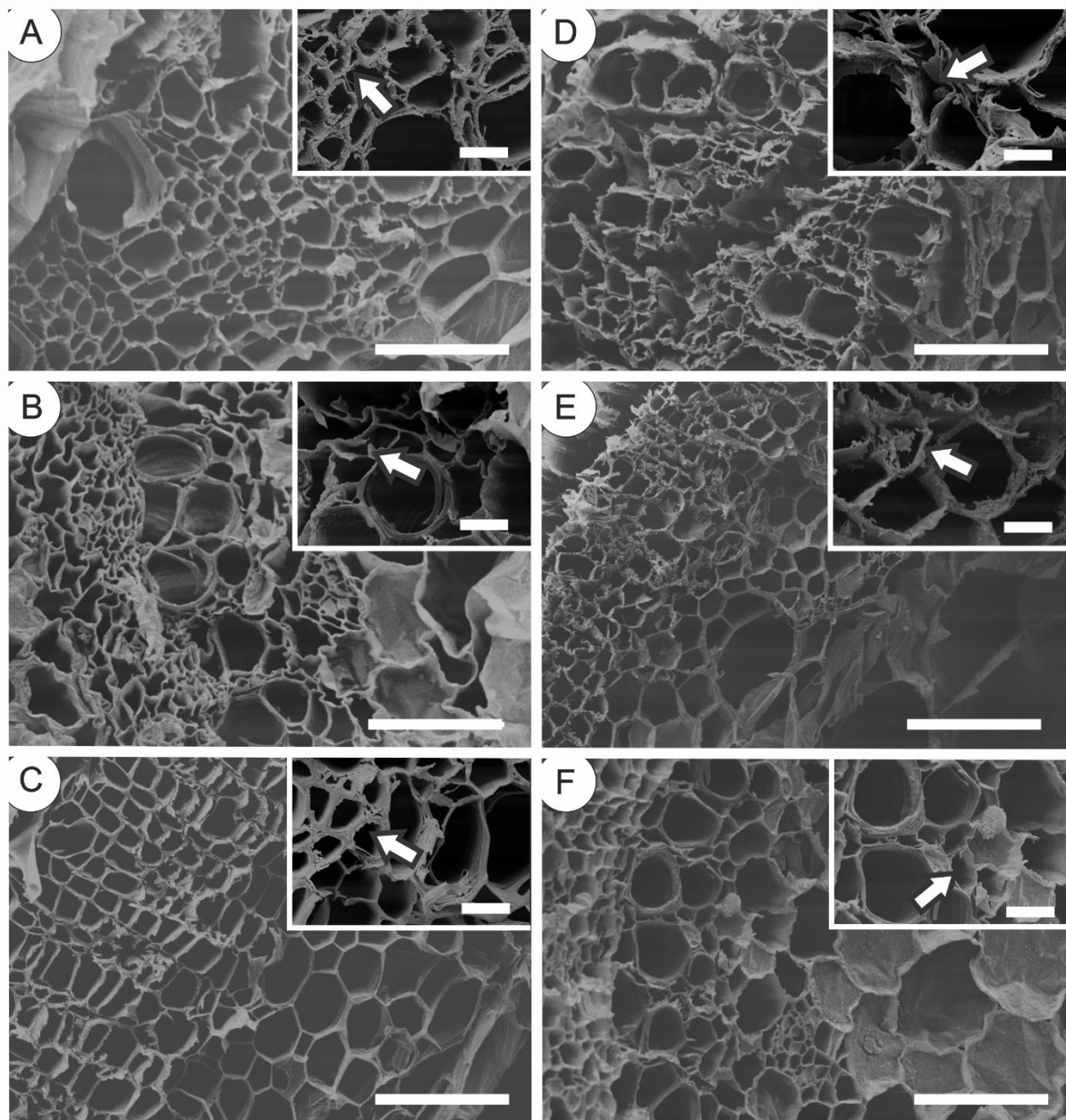
#### 4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura

Considerando as variações morfológicas (Figuras 2B-D e 3B-D), fisiológicas (Figuras 4A-B) e anatômicas (Figuras 15-21) do caule decidiu-se expandir este estudo para uma análise mais detalhada das alterações da parede celular do xilema secundário através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). De forma geral, essa análise permitiu a distinção das diferenças da parede dos elementos de vaso e das fibras do xilema revelando variações consideráveis particularmente na espessura delas (Figuras 22 e 23).

De modo qualitativo, verificou-se aumento da espessura da parede celular das fibras do xilema em plantas tratadas com GA<sub>3</sub> (10 e 100μM) independente da luminosidade do ambiente de cultivo (Figuras 22B–C, 23B–C). Além disso, verificou-se que essas paredes estavam organizadas e bem delimitadas. De modo oposto, com redução dos níveis endógenos de GAs, via aplicação de PBZ, observou-se paredes das fibras mais finas e frágeis, nas plantas cultivadas no sol e na sombra (Figuras 22D e 23D). Para as plantas tratadas com PBZ e submetidas à suplementação com GA<sub>3</sub> (10 e 100μM) o fenótipo do tratamento GA10P foi parcialmente restaurado (Figura 22E) enquanto GA100P apresentou-se restauração completa da espessura das fibras (Figura 22F) em relação ao controle indicando um efeito de dose de GA<sub>3</sub> nessa resposta, em ambientes de sol. Em resposta à capacidade de GA<sub>3</sub> em reverter o fenótipo promovido pelo PBZ, os tratamentos GA10P e GA100P (Figuras 23E e 23F) apresentaram fibras com paredes mais finas quando comparadas aos tratamentos GA10 e GA100 (Figuras 23B e 23C) à sombra, porém mais espessas em relação às plantas tratadas apenas com PBZ (Figura 23D). Registra-se que à sombra a suplementação de GA<sub>3</sub> em plantas tratadas com PBZ (GA10P e GA100P) recupera apenas parcialmente o fenótipo de fibras mais espessas mostrado pelas plantas GA10 e GA100 (Figuras 23E e 23F). Cabe ressaltar que não foram encontradas evidências de alterações da espessura da parede dos elementos de vaso em relação aos tratamentos com GA<sub>3</sub> e/ou PBZ em nenhuma combinação avaliada.



**Figura 22** – Microscopia eletrônica de varredura de caules de tabaco cultivadas em  $A_{IR}$  (100% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de  $GA_3$ : Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Barra = 500 $\mu$ m e 20  $\mu$ m (box). Setas apontam para o detalhe da espessura da parede das fibras do xilema.

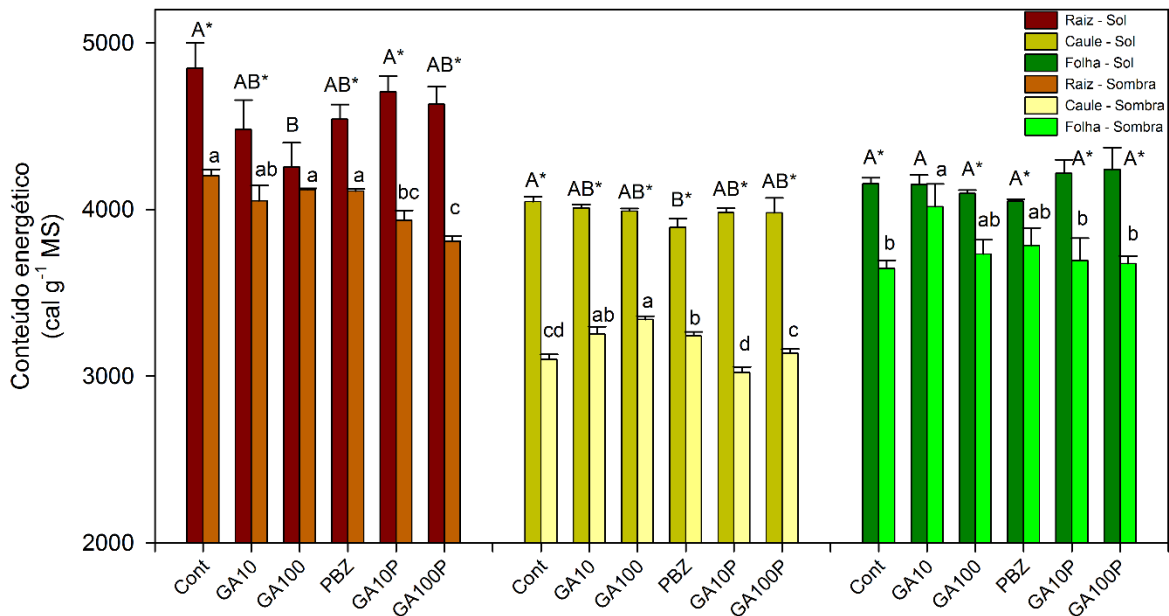


**Figura 23** – Microscopia eletrônica de varredura de caules de tabaco cultivadas em B<sub>IR</sub> (8,5% de irradiância) em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub>: Cont (A); GA10 (B); GA100 (C); PBZ (D); GA10P (E) e GA100P (F) aos 20 dias. Siglas conforme Figura 1. Barra = 100µm e 20 µm (box). Setas apontam para o detalhe da espessura da parede das fibras do xilema.

#### 4.5. Análise calorimétrica

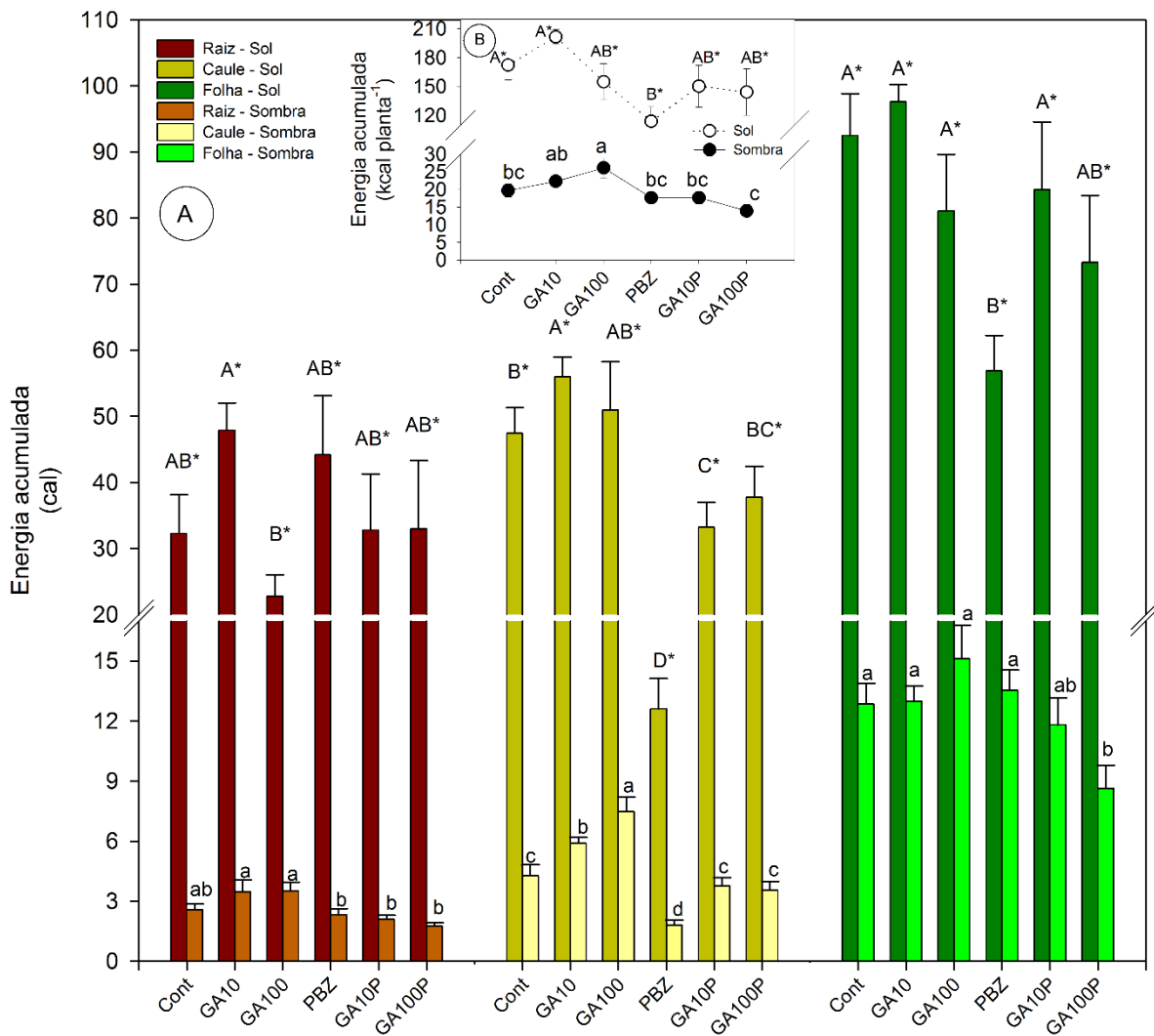
O conteúdo energético e a energia acumulada em raízes, caule e folhas foram maiores em plantas de ambiente de sol em relação ao ambiente de sombra (Figuras 24 e 25). Observaram-se maiores aumentos em plantas de sol da energia acumulada da raiz (>560%), caule (>580%) e folhas (>437%), além da energia total acumulada (>545%) comparando as plantas cultivadas em ambientes de sombra (Figuras 25A–B).

Considerando as alterações promovidas por GA<sub>3</sub> e/ou PBZ no caule, observaram-se maiores investimentos para acúmulo de energia do caule em GA10 (17,9% e 38,1%) e GA100 (7,8% e 77,8%) em plantas de sol e sombra comparados aos respectivos controles (Figura 25A). Por outro lado, as plantas submetidas apenas ao PBZ reduziram o conteúdo energético em 73,4% em A<sub>IR</sub> e 57,5% em B<sub>IR</sub>, ambos em relação aos controles (Figuras 24). Além disso, em plantas tratadas com PBZ e submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> apresentaram menor energia acumulada no caule. Desse modo, os tratamentos GA10P (29,9% e 11,9%) e GA100P (22,8% e 16,6%) em plantas de sol e sombra, respectivamente, apresentaram menor conteúdo energético acumulado (Figura 25B). A aplicação de GA<sub>3</sub> não restaura plenamente os valores energéticos totais das plantas à sombra (Figura 25B).



**Figura 24** – Conteúdo energético da raiz, caule e folhas de plantas de tabaco submetidas à aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (para mais detalhes das siglas veja na Figura 2). Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

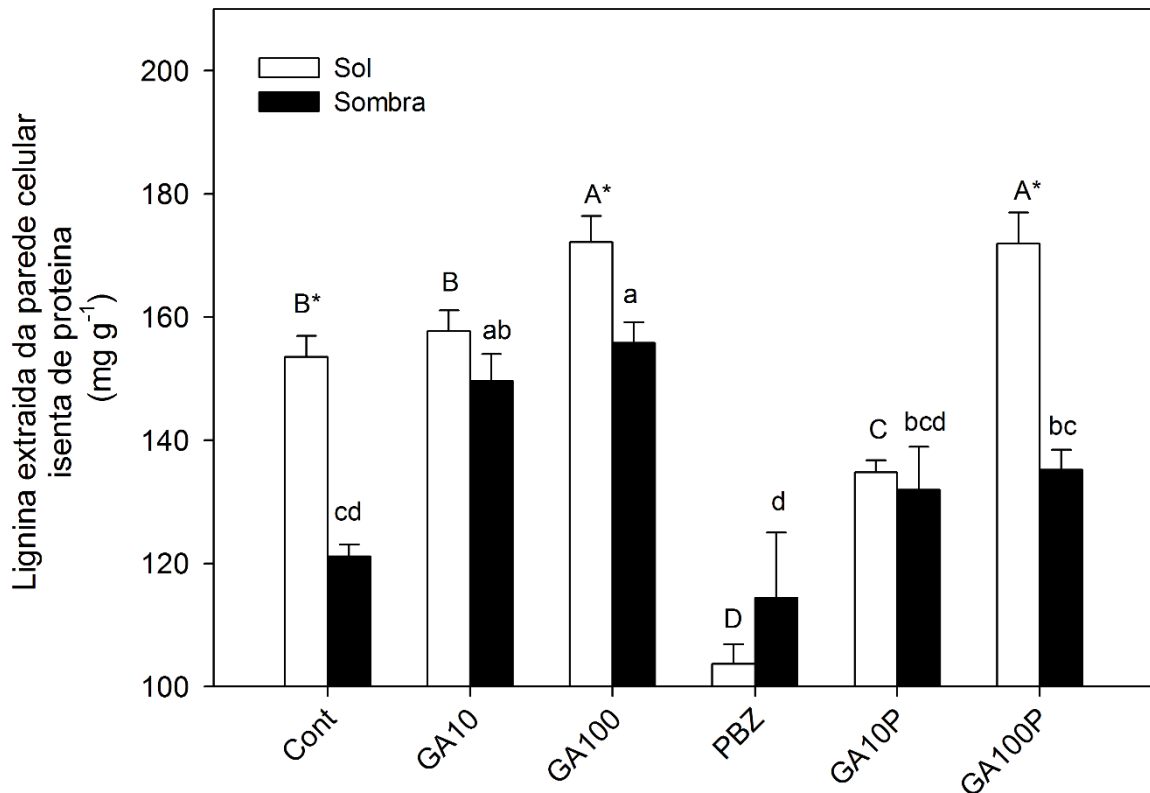




**Figura 25** – Energia acumulada da raiz, caule e folha (A); energia acumulada total (B) em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

#### 4.6. Quantificação de lignina

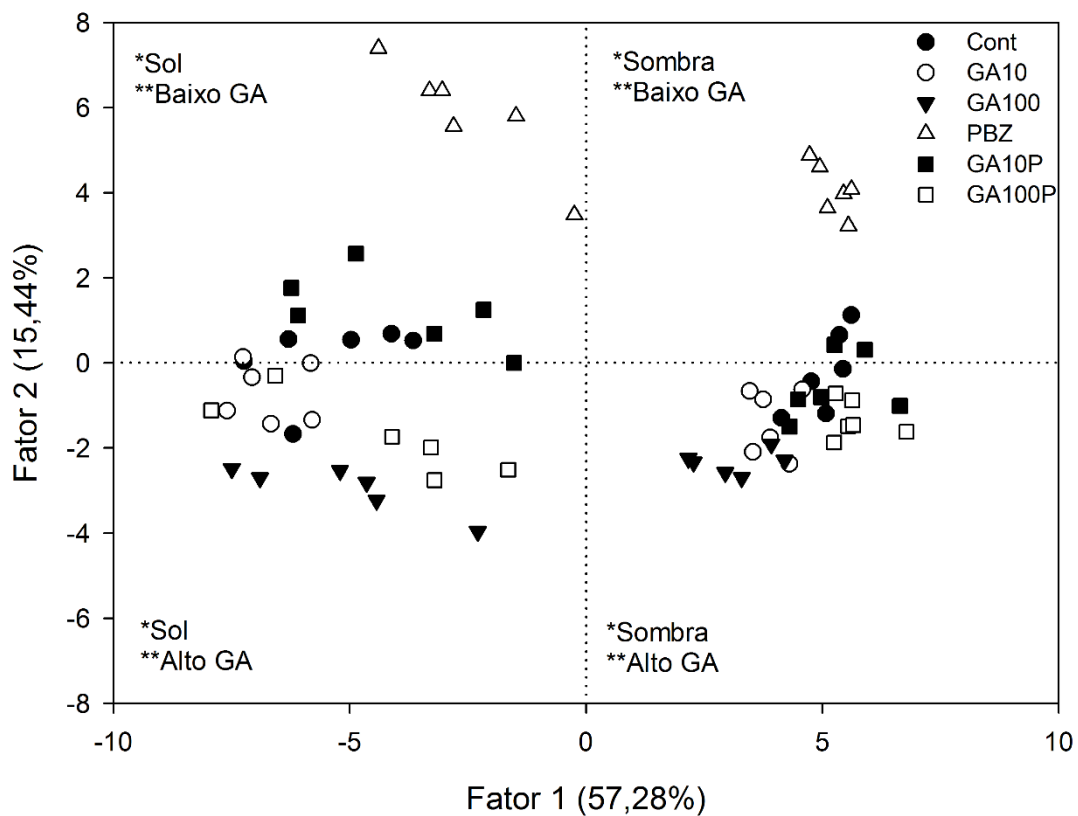
Considerando principalmente o aumento na frequência das FX (Figura 15B) e a maior espessura das paredes celulares dessas células (Figuras 22 e 23) optou-se pela quantificação dos teores de lignina (Figura 26) no caule. Os teores de lignina no Cont são inferiores (redução de 20,9%) nas plantas cultivadas em B<sub>IR</sub> em relação às plantas de A<sub>IR</sub> indicando forte efeito da luz sobre o acúmulo de ligninas na parede secundárias das células das FX e elementos traqueais. A aplicação de GA<sub>3</sub> isoladamente induziu aumento nos teores de lignina no caule em 12,4% para GA10 e 28,1% para GA100 à pleno sol, enquanto que o tratamento isolado com PBZ promoveu reduções na ordem de 32,6% todos em relação ao controle (Figura 26). Por outro lado, em ambiente sombreado houve aumento dos teores de lignina de 23,1% para GA10 e 28,2% para GA100 enquanto aplicação isolada de PBZ resultou-se em diminuição de apenas 5% em relação aos seus respectivos controles (Figura 26). A aplicação de GA<sub>3</sub> foi capaz de restaurar/aumentar os teores de lignina no caule em plantas tratadas com paclobutrazol (tratamentos GA10P e GA100P) em plantas cultivadas à pleno sol enquanto esse efeito é apenas marginal, tendendo à saturação para a maior dose de GA<sub>3</sub> aplicada para as plantas cultivadas à sombra. Registra-se que o tratamento GA100P aumentou-se em 11,8% e 11,5% os teores de lignina em relação ao controle em plantas de sol e sombra, respectivamente (Figura 26). Ademais, observaram-se diferenças extremas entre a dose mais alta de GA<sub>3</sub> (100µM) e PBZ, sendo que PBZ apresentou-se reduções na ordem de 40,1% para sol e 26,4% para as plantas de sombra (Figura 26). Mesmo apresentando teores inferiores de lignina em relação ao respectivo tratamento à pleno sol, a aplicação de GA<sub>3</sub> à sombra é capaz de induzir o acúmulo de lignina no caule de plantas cultivadas e os aumentos ( $p \leq 0,05$ ) são mais expressivos para aplicação isolada de GA<sub>3</sub> e menores nas combinações com paclobutrazol.



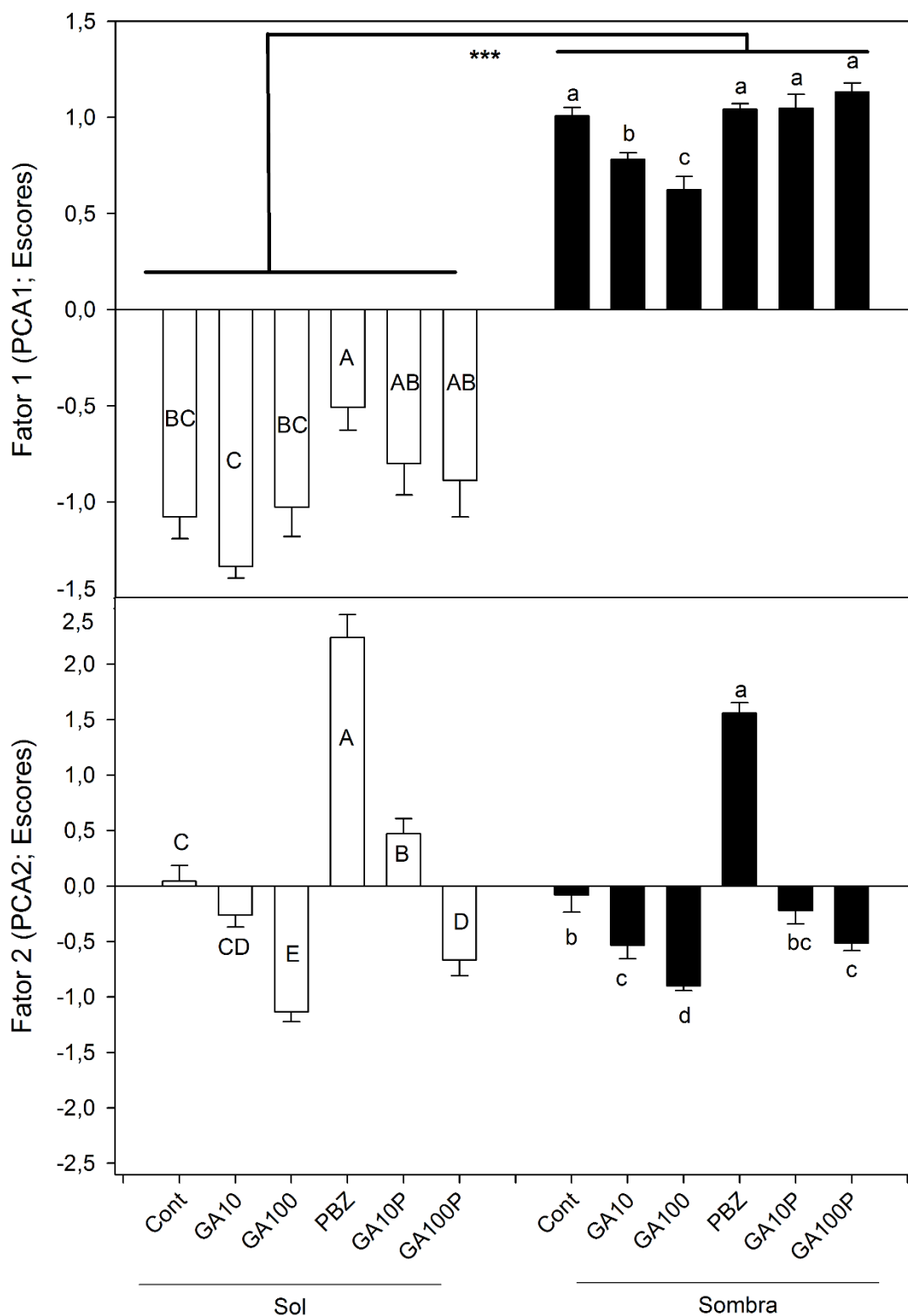
**Figura 26** – Teores de lignina do caule em plantas de tabaco submetidas a aplicação de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol em diferentes combinações e ambientes de A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub>. Siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2. n=6±SE.

#### 4.7. Análise multivariada

Análise de componentes principais (PCA) foi feita de modo a estimar a contribuição individual (ou de grupos correlacionados) das variáveis analisadas no trabalho para o acúmulo de lignina nas plantas. Por meio de análise de componentes principais, foi possível identificar que o primeiro componente (PCA1 – maior variância; 57,28%) foi capaz de separar os tratamentos aplicados em dois grandes grupos (Figura 27 e 28). Atribui-se ao PCA1 elevada participação dos níveis de luz, que isoladamente possibilitou todos os tratamentos A<sub>IR</sub> serem diferenciados daqueles B<sub>IR</sub>. Ainda, o PCA1 é responsável pelo maior grau de explicação no que tange o grau de variabilidade do acúmulo de lignina nos tecidos da planta. O segundo componente (PCA2 – menor variância; 15,44%), correlacionou-se mais fortemente com as variações nos níveis de GAs na planta (Figura 27). Para as plantas crescidas em A<sub>IR</sub>, distingue-se significativamente entre os níveis mais altos de GA (GA10 e GA100) daqueles com menores teores de lignina (PBZ, GA10P e GA100P) (Figura 28).



**Figura 27** – Distribuição espacial dos escores estimados de cada repetição e tratamento em relação ao componente principal 1 (PCA1) e ao componente principal 2 (PCA2) e seus respectivos percentuais da variância total explicadas por cada um dos componentes em relação ao acúmulo de lignina. Sugestivamente atribui-se aos quadrantes uma forte aderência dos tratamentos com níveis de luz\* e com os níveis de GAs\*\*. Siglas conforme Figura 1.



**Figura 28** – Escores estimados dos tratamentos em relação aos componentes principais (PCA1 e PCA2). Médias seguidas de letras maiúsculas ou minúsculas distintas representam diferenças estatísticas pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) na mesma irradiância e entre diferentes níveis de GA<sub>3</sub>. \*\*\*Asteriscos sobre as médias representam diferenças estatísticas pelo teste *t* de Student ( $p \leq 0,001$ ) entre distintas irradiância no mesmo nível de GA<sub>3</sub>. Demais siglas e comparações estatísticas conforme Figura 2.  $n=6 \pm SE$ .

A análise dos autovetores (correlação linear entre uma dada variável com um dado componente principal) mostra que o PCA1 correlaciona-se fortemente com os componentes primários em relação à MS total (-0,9768), da folha (-0,9737), do caule (-0,9269), diâmetro do caule (-0,9222), pigmentos como  $Chl_{a+b}$  expressos por massa (0,8991), mas não por área (-0,0815) e os dados derivados da análise primária do crescimento como razão de área foliar (0,9144) (Tabela 3). Do ponto de vista calorimétrico, maior associação foi para o valor energético da matéria seca do limbo (-0,9759) enquanto entre os componentes anatômicos à espessura do xilema (-0,8422) foi o mais correlacionado (Tabela 3). Em paralelo, e em relação ao PCA2, o maior autovetor (em módulo) foi dos componentes derivados e primários da análise de crescimento, como razão de massa caulinar (-0,8841), comprimento dos entrenós (-0,8550) e comprimento do caule (-0,7106). Entre os dos pigmentos  $Chl_{a+b}$  por área (0,7562) e anatômicos, em especial ao número de fibras (-0,4970) e espessura total da folha (0,4186) são as variáveis individuais que mais fortemente se associam com o PCA2 (Tabela 3).

De posse dos dados dos autovetores, procedeu-se um agrupamento empírico das diferentes variáveis analisadas em cinco grupos de acordo com associação experimental “natural” de cada grupo. São eles: dados primários de crescimento, pigmentos fotossintéticos, crescimento derivados, calorimétricos e anatômicos. Por meio do somatório dos autovalores (quadrado dos autovetores) e o cálculo do autovalor parcial (normalizado pelo número de variáveis de cada grupo) dos grupos em relação ao total (independente para cada autovetor) foi possível atribuir estatisticamente um “grau de explicação” do grupo para o respectivo componente principal. Optou-se pelo uso de “grupos” em função de que, entre as variáveis de cada grupo, existe um elevado grau de correlação ou ainda são variáveis auto-correlacionadas. Para o fator 1 (PCA1), fortemente associado à luz, os maiores percentuais de explicação foram ligados ao grupo calorimétrico (26,8%) e crescimento primário (21,7%), seguindo pelo anatômico (19,6%) e menor grau pelos pigmentos (13,5%) da variabilidade total observada (Tabela 2). Entretanto, para o fator 2 (PCA2), mais fortemente ligado aos níveis de GAs, o maior percentual de explicação foi o grupo dos pigmentos (28,7%) e crescimento derivados (28,4%) da variabilidade total. Salienta-se que nesses grupos as variáveis de maior contribuição individual são  $Chl_{a+b}$  expressos por unidade de área, comprimento do caule e dos entrenós. Por outro lado, os dados calorimétricos contribuem menos (5%) para explicação da variância total deste componente (Tabela 2).

**Tabela 2** – Porcentagem de explicação do acúmulo de lignina (lignina extraída) ou da variância total por diferentes grupos de dados experimentais pelos PCA1 e PCA2 estimados via análise de componentes principais.

<b>Grupo</b>	<b>PCA 1</b>	<b>PCA 2</b>
Crescimento primário	21,7%	24,1%
Pigmentos	13,5%	28,7%
Crescimento derivados	18,4%	28,4%
Calorimetria	26,8%	5,0%
Anatomia	19,6%	13,8%
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

**Tabela 3** – Autovetores estimados para PCA1 e PCA2 das diferentes variáveis avaliadas experimentalmente de plantas de tabaco em resposta a variação do conteúdo de GA<sub>3</sub> (Cont, GA10, GA100, PBZ, GA10P e GA100P) em A<sub>IR</sub> e B<sub>IR</sub> (100 e 8,5% de irradiância).

<b>Grupos</b>	<b>Variável</b>	<b>Autovetores</b>	
		<b>PCA1</b>	<b>PCA2</b>
Crescimento Primário	Raiz (cm)	-0,436813	0,211567
	Raiz (g)	-0,861710	0,272484
	Caule (cm)	-0,619121	-0,710668
	Caule (g)	-0,926972	-0,226145
	Diâmetro do caule (cm)	-0,922232	0,135265
	Comprimento entrenó (cm)	-0,205977	-0,855033
	Número folhas (número)	-0,892337	-0,226129
	Folha (cm <sup>2</sup> )	-0,891445	-0,177833
	Folha (g)	-0,973847	0,028982
	Altura total (cm)	-0,665207	-0,650220
	Matéria seca (g)	-0,976877	0,016969
	Comprimento da maior folha (cm)	-0,698190	-0,405736
	Densidade de área foliar (cm <sup>2</sup> cm <sup>-3</sup> )	-0,730541	-0,487178
Pigmentos	Chla (mg m <sup>2</sup> )	-0,164393	0,718819
	Chlb (mg m <sup>2</sup> )	0,146259	0,720614
	Chla+b (mg m <sup>2</sup> )	-0,081594	0,756212
	Carotenoides (mg m <sup>2</sup> )	-0,344261	0,720618
	Chla/Chl b (mg m <sup>-2</sup> )	-0,489369	0,018480
	Chla (mg g)	0,872520	-0,026427
	Chlb (mg g)	0,909830	-0,043926
	Chla+b (mg g <sup>-1</sup> )	0,899166	-0,032352
	Carotenoides (mg g <sup>-1</sup> )	0,894137	-0,077177
	Chla/Chlb (mg g <sup>-1</sup> )	-0,489369	0,018480

**Tabela 3 – Cont.**

<b>Crescimento derivados</b>	RMR – Razão de massa radicular ( $\text{g g}^{-1}$ )	-0,566198	0,540384
	RMC – Razão de massa caulinar ( $\text{g g}^{-1}$ )	-0,163612	-0,884117
	RMF – Razão de massa foliar ( $\text{g g}^{-1}$ )	0,679032	0,291201
	RAF – Razão de área foliar ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	0,914472	-0,214089
	AFE – Área foliar específica ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	0,849075	-0,330293
	PA:SR ( $\text{g g}^{-1}$ )	0,696151	-0,389422
	IAF – Índice de área foliar ( $\text{cm}^2 \text{cm}^{-2}$ )	-0,906649	0,103567
<b>Calorimetria</b>	Raiz ( $\text{cal g}^{-1}$ )	-0,709815	0,192241
	Caule ( $\text{cal g}^{-1}$ )	-0,954559	0,083612
	Limbo ( $\text{cal g}^{-1}$ )	-0,682957	0,046077
	MS Total ( $\text{cal g}^{-1}$ )	-0,903527	0,126736
	Raiz acúmulo (kcal)	-0,859300	0,282041
	Caule acúmulo (kcal)	-0,929274	-0,210305
	Limbo acúmulo (kcal)	-0,975942	0,024766
	Planta acúmulo (kcal)	-0,976851	0,030280
Custo da área foliar ( $\text{cal cm}^{-2}$ )	-0,809602	0,383046	
<b>Anatomia</b>	Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	-0,711916	0,418683
	Espessura do xilema ( $\mu\text{m}$ )	-0,842240	-0,298389
	Comprimento da fibra do xilema ( $\mu\text{m}$ )	0,527793	0,006002
	Elemento de vaso (número)	-0,836563	0,026074
	Fibras (número)	-0,772557	-0,497039



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito das giberelinas sobre o crescimento e interceptação da luz

A interceptação de luz é necessária e possibilita o balanço fotossintético líquido positivo (PUGNAIRE; VALLADARES, 2007) para a sobrevivência das plantas. Sabe-se que os componentes morfológicos como a área foliar (Tab. 2), e como as folhas estão distribuídas no dossel numa arquitetura tridimensional das plantas (PEARCY, 2007; PUGNAIRE; VALLADARES, 2007) influenciam as taxas fotossintéticas e conseqüentemente o ganho de  $MS_T$ . A variação promovida pela luz e GAs sobre o comprimento dos entrenós e volume total da planta (Figuras 1, 3C e 6) mostram que em condições de sombreamento ou em aplicações de  $GA_3$  as plantas possuem maiores entrenós que, por sua vez, possibilita a elas uma melhor distribuição da luz e a uma maior taxa de fotossíntese líquida não apenas nas folhas superiores, mas também nas folhas da porção inferior da planta, que explicaria, pelo menos em parte maiores valores de TAL nessa condição, ou seja, uma alta correlação entre a TAL e o volume do cone (VC) e entre a TAL e a densidade de área foliar (DAF) para as plantas de ambientes de sombra ( $r=0,75$  e  $-0,63$ ;  $p\leq 0,05$ ) e baixa correlação ( $r=-0,15$  e  $0,09$ ;  $p\leq 0,05$ ) para as plantas de ambientes de sol, confirmando o efeito da distribuição da luz nesses ambientes. Salienta-se que apenas na sombra e com forte restrição de luz para a fotossíntese (8,5% de luz solar disponível) o maior espaço vertical entre folhas com orientação similar possibilita às plantas uma melhor interceptação da luz incidente com possivelmente menores índices de auto-sombreamento que garantem a essas plantas com maior comprimento dos entrenós uma diminuição das limitações fotossintéticas refletido no aumento da TAL. A TAL avalia em termos médios à assimilação de C por unidade de área foliar e tempo, no ciclo de crescimento das plantas e verifica que os tratamentos com mais GAs apresentaram maiores eficiências assimilatórias na sombra (Figura 5D) embora a maior AF das plantas crescidas a pleno sol garante a essas plantas uma maior  $MS_T$  (THETFORD et al., 1995; NAGEL; LAMBERS, 2002; HEDDEN; THOMAS, 2016). Numa condição onde a luz não é um fator limitante para a fotossíntese (tratamentos  $A_{IR}$ ) o ganho proporcionado na TAL pelo aumento nos comprimentos do caule e dos entrenós é mínimo (HIROSE, 2005).

Poucos são os trabalhos disponíveis que tratam dos efeitos das GAs sobre fotossíntese e, em geral, são inconclusivos ou contraditórios (NAGEL; LAMBERS, 2002; HEDDEN; THOMAS, 2016). Do ponto de vista global, a menor TAL nas plantas  $A_{IR}$  não é explicado apenas por uma saturação fotoquímica da fotossíntese (PEARCY, 2007) e explicações mais

inclusivas para a menor eficiência de ganho da MS consiste da diminuição da AFE (Figura 4E), aumento da RMR (Figura 4D), maior investimento em “estruturas anatômicas” da folha (folhas mais espessas, maior número de células e camadas do mesofilo) (Figuras 12, 13D e 14D), especialmente com acúmulo de estruturas não ligadas diretamente à fotossíntese, elevado custo do incremento de pigmentos por área e massa (Figuras 7 e 8), adensamento dos tilacoides e ainda redução das mudanças de transcritos e metabólitos afetando o crescimento pelo desacoplamento da disponibilidade de carbono (RIBEIRO et al., 2012) ou ainda mobilização de parte do conteúdo energético (Figuras 24 e 25) de folhas e caule para manutenção, respiração e crescimento das raízes (THETFORD et al., 1995). Essas respostas foram especialmente afetadas em plantas tratadas apenas com PBZ numa condição de sombreamento cuja irradiância disponível para as plantas é inferior ao ponto de saturação (dados não mostrados). De forma oposta, plantas com níveis mais altos de GAs apresentam folhas mais finas (menor investimento em células do mesofilo) (Figuras 12, 13 e 14), menor RMR, possivelmente tilacóides mais espalhados e maior acoplamento de energia para acúmulo de biomassa (Figura 2). Cabe ressaltar que apesar de alto investimento energético em células no caule (Figura 25A), estes são mais lignificados, porém exibem baixa taxa de manutenção após a sua formação.

Não obstante, em resposta aos incrementos nos níveis de GA<sub>3</sub> evidenciaram-se maiores valores para TCA e TCR da MS<sub>T</sub> da planta e do caule associados à variação dos valores da TAL (NAGEL; LAMBERS, 2002; HEDDEN; SPONSEL, 2015) em resposta a ambientes com maior ou menor disponibilidade de luz que em última instância agregou maior acúmulo de lignina total pelas plantas. Por outro lado, os dados de RAF, RMF e AFE reforçam a ideia de que mesmo em ambientes com baixa disponibilidade de luz e consequentemente maiores níveis de GAs endógenas (KUREPIN et al., 2006) possibilitam ainda maior atividade da GA20ox em relação a GA2ox (KUREPIN; PHARIS, 2014), mantendo taxas de crescimento elevadas (Figuras 2, 3 e 4) e principalmente lignificação dos tecidos das FX e incremento de fibras. Com base nos dados de PCA (Tabelas 2 e 3), a luz explica melhor as variações de MS<sub>F</sub>, RAF e IAF visando os teores de lignina em plantas de tabaco sob diferentes irradiâncias, evento que se encontra relacionado ao grau de plasticidade fenotípica de uma planta em um determinado ambiente e também em resposta a sinalização celular de GAs derivadas das folhas (HOFFMANN; POORTER, 2002; DAYAN et al., 2012). Curiosamente, os níveis de GAs aumentados na folha tem mais influência sobre o caule (RMC) e, de forma intrigante, sob a raiz (RMR) (NAGEL; LAMBERS, 2002; GUO et al.,

2015). Esses resultados sugerem um mecanismo associado ao transporte do hormônio na planta ou a algum mecanismo ainda desconhecido associado com a sinalização das giberelinas nas folhas e transmissível pelo corpo da planta (DAYAN *et al.*, 2012).

Alguns dos aspectos mais intrigantes envolvem diferentes níveis de GAs e luz no quais ambos promovem alterações das propriedades ópticas das folhas (Figura 9) (CARRIELLO *et al.*, 2003; MARTINS, 2013) de modo a maximizar, monitorar e ajustar o crescimento e desenvolvimento das plantas (FOLTA; MARUHNICH, 2007). Nesse sentido, plantas tratadas apenas com PBZ apresentaram maior espessura da folha, formação de uma segunda camada de células do parênquima paliçádico (não presente nos demais tratamentos), células mais justapostas, redução dos espaços intercelulares (Figura 13D e 14D), acúmulo de pigmentos por área (figura 7) que resultou-se em maior absorvância da luz (figura 9) na faixa dos 400 a 700nm (CARRIELLO *et al.*, 2003). Em comparação entre absorvância da folha e dos pigmentos evidencia-se que sobre influência do PBZ sobre os pigmentos foliares (*in vitro*) possuem picos de absorção mais em 450nm (azul) e 674nm (vermelho) e da folha (*in vivo*) maior no vale dos 550nm (verde). A alta correlação ( $r=0,929$ ) entre os pigmentos foliares e absorvância da folha em 550nm para plantas de sol e fraca ( $r=0,258$ ) para as de sombra (Figuras 9, 10 e 11), mostra-se relação direta entre o maior conteúdo de clorofilas e maior absorvância pela folha no verde e no vermelho em plantas cultivadas à pleno sol (Figura 10) (SIMS; GAMON, 2002; CARRIELLO *et al.*, 2003) e, juntamente com a presença, tipo, quantidade de pigmentos, espessura do limbo, volume dos espaços intercelulares e possivelmente disposição dos tilacoides afetou diretamente as propriedades ópticas da folha (CARRIELLO *et al.*, 2003; MARTINS, 2013). De forma complementar, salienta-se que os comprimentos de ondas em torno dos 550nm podem suprir a demanda energética quando os fotossistemas estiverem limitados por luz azul e vermelha, deslocando a proporção para a faixa do verde que antes prontamente refletida torna-se transmitida através dos tecidos das plantas (FOLTA; MARUHNICH, 2007). Do ponto de vista ecofisiológico, as plantas não ignoraram um insumo ambiental condicional e necessário à sobrevivência e dessa forma as plantas poderiam usar todo o espectro e proporções relativas de energia interna para ajustar sua forma, composição e fisiologia para melhor aproveitar as condições prevaletentes do meio (FOLTA; MARUHNICH, 2007; WANG; FOLTA, 2013). O aumento na absorção do verde parece ser uma das formas de redução das limitações fotoquímicas da fotossíntese. A baixa correlação entre os teores de pigmentos fotossintéticos e absorvância da folha no verde em plantas de sombra sugere que alterações estruturais nos cloroplastos devem existir de

modo a possibilitar similar e elevada absorvência mesmo com menores teores de pigmentos por unidade de área. Ademais, ligado a alterações no arranjo tridimensional da folhagem e uma melhor distribuição da luz no dossel com menores índices de auto-sombreamento garantem a elas uma maior TAL e aumento na  $MS_T$  com aumento nos níveis de GAs. Salienta-se que a aparente maior concentração de pigmentos fotossintéticos por unidade de área nas plantas tratadas apenas com PBZ à sombra não garantiu a essas plantas um aumento na  $MS_T$ , evidenciando que a distribuição da luz no dossel é uma resposta primordial em relação ao acúmulo de  $MS_T$  e menos importante é a concentração de clorofilas por área.

## 5.2. Efeito das giberelinas e da luz sobre a lignificação

Mostra-se, nesse trabalho que ocorre estímulo à lignificação (deposição de lignina) nas plantas de tabaco cultivadas em ambientes tanto de alta e quanto de baixa irradiância em função do aumento provável dos níveis endógenos de GAs (KUREPIN et al., 2006, 2007; KUREPIN; PHARIS, 2014). Ainda, ocorre estímulo à atividade mitótica com um maior número de células de fibras xilemáticas na zona cambial e células com paredes mais espessadas e outras alterações anatômicas. A aplicação de  $GA_3$  promoveu aumento no ganho de MS do caule, comprimento dos entrenós, na interceptação de luz incidente, e eficiência da conversão energética e energia acumulada na formação dos tecidos da planta.

As plantas de tabaco obtiveram maior acúmulo de  $MS_F$ ,  $MS_C$ ,  $MS_T$  e AF (Figura 2) associados supostamente aos maiores níveis endógenos de GAs via aplicação de  $GA_3$  e menores pela aplicação de paclobutrazol (KUREPIN et al., 2006; RIBEIRO et al., 2012; GUO et al., 2015; ZHU et al., 2016). Evidências fundamentadas em análise multivariada (análise de componentes principais) (Figuras 27, 28 e Tabela 3) indicam que a luz é responsável pela maior variabilidade fenotípica (PCA1), porém a alteração nos níveis endógenos de GAs (PCA2) também promovem alterações da deposição de substâncias formadoras da célula vegetal, como a celulose e/ou lignina (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004), alterações do comprimento dos entrenós e interceptação da luz (GIVNISH, 1988; KUREPIN; PHARIS, 2014). Essas alterações fenotípicas são por fim o resultado conjunto de variações nos mecanismos de regulação celular desencadeados pelas respostas à expressão de genes e atividade de enzimas (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; WANG et al., 2015; VOOREND et al., 2016). O uso de GAs e/ou reguladores de crescimento como PBZ ou ainda em plantas transgênicas com aumento/redução dos níveis endógenos de GAs, evidenciam que esse hormônio está relacionado com as alterações na expressão de genes

responsáveis pela biossíntese de lignina (ISRAELSSON, 2004), deposição, construção e modificação (extensibilidade) da parede celular em plantas de tabaco (DAYAN et al., 2010; GUO et al., 2015), *Arabidopsis* (RIBEIRO et al., 2012), cenoura (WANG et al., 2015), milho (VOOREND et al., 2016) e outras espécies (DAVIÈRE; ACHARD, 2013; YANG et al., 2015). Essas alterações encontram-se associadas a maior ou menor atividade das enzimas GA20ox, GA3ox e GA2ox que regulam a homeostase de GAs assim como um maior aumento da ICA e atividades de PAL, POD, e CAD que se inter-relacionam entre os mecanismos por sinalização da luz, na via biossintética dos fenilpropanoides e das GAs (BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; YAMAGUCHI, 2008; MOURA et al., 2010; KUREPIN; PHARIS, 2014; HEDDEN; SPONSEL, 2015; KIM et al., 2016). Maiores conteúdos de GAs tendem a promover maior deposição de lignina nas células do caule (Figura 26) em especial aquelas relacionadas como número de fibras do xilema e na parede das fibras do xilema (Figuras 22 e 23) conforme mostrado em plantas cultivadas em ambientes sob alta ou baixa irradiâncias. Ademais, foram evidenciados em trabalhos com tabaco e outras espécies que maior quantidade de fibras do xilema (ERIKSSON et al., 2000; BIEMELT; TSCHIERSCHE; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2010; GUO et al., 2015) estão positivamente associados com o aumento de GAs enquanto menor disponibilidade de luz induz a redução dos teores de lignina nas plantas (Figura 26). Além disso, um efeito aditivo entre GA<sub>3</sub> e luz pode estar envolvido para a indução da formação das fibras do xilema, indicando que GAs são fundamentais para o desenvolvimento em baixa irradiância enquanto em alta incidência de luz exerceria um efeito aditivo representando um componente mais forte na indução e formação do número de fibras do xilema.

A biossíntese de lignina é afetada em resposta a variação da disponibilidade de luz conforme relatado em outros trabalhos (SCHOPFER; LAPIERRE; NOLTE, 2001; CHEN et al., 2002; KIMURA et al., 2003; SYROS; YUPSANIS; ECONOMOU, 2005; ANDERSSON-GUNNERÅS et al., 2006; AKGUL; ÇOPUR; TEMIZ, 2007). Mostra-se por PCA que a luz exerce forte papel na lignificação das plantas e sob a suplementação com maiores concentrações de GA<sub>3</sub>, os efeitos tornam-se aditivos. Demonstra-se o efeito aditivo da luz e GAs nos tratamentos com GA10, GA100 e GA100P em ambientes de sol, no qual a aplicação de GA<sub>3</sub> estimula a maior deposição de lignina (Figura 26), aumento da frequência (Figura 16B) e da espessura das fibras do xilema (Figuras 22 e 23), ao passo que o Cont, sob alta irradiância, apresenta os teores de lignina semelhantes à GA10, mesmo sem a suplementação de GA<sub>3</sub> indicando dessa forma que luz induz a xilogênese e modula a expressão de genes e

enzimas importantes como PAL que propiciam a diferenciação do xilema (ROBERTS; GAHAN; ALONI, 2008) com incremento do número de fibras (BIEMELT; TSCHIERSCH; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2010), mas não necessariamente promovem alterações dos elementos de vaso (ISRAELSSON, 2004). Cabe ressaltar que tratamentos como o PBZ e GA10P em alta disponibilidade de luz não apresentaram aumento da deposição de lignina (Figura 26), possivelmente devido a inibição da KO e maior acúmulo de DELLA (OLSZEWSKI; SUN; GUBLER, 2002; UEGUCHI-TANAKA et al., 2007).

As plantas cultivadas sob baixa irradiância apresentaram deposição de lignina nos tratamentos com mais GAs (GA10 e GA100) indicando que, sob baixa irradiância, concentrações adicionais de GAs são importantes para estimular a lignificação e diferenciação de fibras, dispensando a necessidade da luz para esses processos. Por outro lado, para tratamentos como GA10P, GA100P à sombra, a suplementação com GAs não foi suficiente para estimular a deposição de lignina e diferenciação de fibras em níveis similares às plantas cultivadas a pleno sol, indicando que luz poderia ser componente estimulatório necessário e obrigatório para ocorrer alta taxa de lignificação dos tecidos. Segundo Kimura (2003) e Roberts et al. (2008) muitos genes são expressos exclusivamente em ambientes de alta irradiância, desse modo indicaria que mecanismos diferentes ocorrem em alta mas não em baixa irradiância, sugerindo que luz possivelmente é um dos componentes ambientais que estimulam a via dos fenilpropanoides (ROBERTS; GAHAN; ALONI, 2008), assim como estimulam genes que codificam enzimas importantes como a PAL, CAD e PODs (AKGUL; ÇOPUR; TEMIZ, 2007) no qual GAs não são capazes de substituir. Considera-se que na rota biossintética das ligninas há uma profusa flexibilidade no metabolismo e regulação gênica, bem como uma complexa interação destes processos com o ambiente (ZHONG; YE, 2009; ZHAO; DIXON, 2011). Salienta-se que as plantas de ambientes de sombra embora apresentem maiores níveis de GAs endógenas (KUREPIN et al., 2006), desse modo, acredita-se que falta de interação com as PIFs, proporcionam maior acúmulo de proteínas DELLA e inibição de enzimas importantes (ex. PAL) (ROBERTS; GAHAN; ALONI, 2008; LOCASCIO; BLÁZQUEZ; ALABADÍ, 2013) que possivelmente possam explicar a redução dos teores de lignina presentes no caule.

Em níveis elevados de GAs, como nas plântulas cultivadas em ambientes de baixa irradiância, os níveis de DELLA são baixos, uma vez que são alvo de degradação, permitindo as PIF3 e PIF4 estejam livres para se ligar aos seus genes alvo. No entanto, em menores níveis de GAs, como nas plântulas cultivadas sob alta luz, as proteínas DELLA acumulam-se

e sequestram os dois PIFs de seus genes-alvo, resultando em fenótipos típicos de plantas de sol, especialmente com entrenós mais curtos. Assim, enquanto a luz controla PIF3 e PIF4 ao nível proteico, GAs regulam a atividade transcricional dos PIFs. Esta dupla regulação de PIF3 e PIF4 representa um ponto de integração para a coordenação da fotomorfogênese das plântulas em resposta à luz e GAs (LAU; DENG, 2010) que sob análise anatômica influenciam nos processos de mobilização de C pela planta e, crescimento e desenvolvimento secundário do caule.

### 5.3. Efeito das giberelinas e da luz sobre a atividade mitótica das FX

GAs estimulam tanto o alongamento quanto a divisão celular, conforme evidenciado pelo aumento do comprimento celular e do número de células (HEDDEN; THOMAS, 2016). De modo semelhante a maior frequência de fibras do xilema foram evidenciados em trabalhos com maiores níveis endógenos de GAs (ERIKSSON et al., 2000; BIEMELT; TSCHERSCH; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2010) enquanto PBZ promoveu drástica redução tanto em número de fibras (GUO et al., 2015; WANG et al., 2015) em plantas  $A_{IR}$  e  $B_{IR}$  (Figura 15B), mas não no comprimento destas (Figura 15C, 18 e 21) (ERIKSSON et al., 2000). Evidências têm mostrado que a inibição da enzima *ent*-caureno oxidase (KO) responsável pela conversão do *ent*-kaureno ao ácido *ent*-kaurenóico pelo PBZ promove colapso da via de biossíntese de GAs culminando em inibição da rota biossintética dos fenilpropanoides (VOGT, 2010; GUO et al., 2015; YUE et al., 2016). Além disso, o PBZ afeta a sinalização de GAs pelo acúmulo de proteínas DELLA (GAI e RGA) e inibe a ligação de GAs ao seu sítio alostérico GID1 impedindo a degradação de DELLA pelo proteassoma 26S indicando que esses mecanismos afetam o crescimento das plantas (GUO et al., 2015; WANG et al., 2015; YUE et al., 2016) assim como a redução do número de fibras (DAYAN et al., 2010), e conseqüentemente menor deposição de lignina além da redução do comprimento do caule (DAYAN et al., 2012). Ademais se ressalta que as GAs modificam a expressão de genes e promove a indução da mitose pelo aumento da atividade de proteínas cinases dependentes de ciclinas (CDKs), por um sinal originado das folhas maduras induzindo a maior atividade cambial e relatado recentemente pela transição de fases do desenvolvimento que coordenam as respostas direcionadas a especificidade em estimular a diferenciação de fibras e crescimento secundário do caule (SAUTER; KENDE, 1992; FABIAN et al., 2000; DAYAN et al., 2012; ALONI, 2013; IKEMATSU et al., 2016).

Pouco é conhecido até o momento em nível transcricional (ISRAELSSON, 2004; WANG et al., 2015) e menos ainda em nível pós-transcricional como, e em que ponto (gene/proteína/metabólito), da rota da biossíntese de lignina seria afetado primariamente ou majoritariamente pelas GAs. Considera-se que é um sistema dinâmico e complexo, em vista que, a biossíntese de lignina não depende apenas da quantidade dos componentes precursores, mas também das atividades enzimáticas que são dependentes de muitos outros fatores (ZHAO; DIXON, 2011). Não se conhece até o momento se alguns genes (e proteínas) estimulados pelas GAs (GUO et al., 2015; WANG et al., 2015) sofrem algum tipo de interação e/ou modulação de sua atividade pelas proteínas DELLA ou as PIF. O mostrado diferencialmente neste trabalho é uma associação direta das GAs em estimular a rota biossintética de lignina de modo independente da luz, embora a luz também afete essa rota biossintética. GA<sub>3</sub> consegue substituir parcialmente (mas não completamente) o efeito da luz na estimulação da deposição de lignina. Foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* que mais de 7000 genes exibiram expressão alterada quando as plantas foram submetidas a alta intensidade de luz e que dentre estes 110 mostram expressão aumentada, sendo vários envolvidos diretamente na via de biossíntese de lignina e associados com variação de GAs e outros hormônios (KIMURA et al., 2003; MOURA et al., 2010). De modo geral, plantas crescidas em B<sub>IR</sub> têm maiores níveis de GAs (KUREPIN et al., 2006, 2007; KUREPIN; PHARIS, 2014) e menores de lignina (Figura 26) de modo proporcional à quantidade de luz incidente, ou seja, quanto menos luz, maiores os teores GAs e menores os de lignina (e vice-versa). Por essa analogia direta seria possível inferir que as GAs atuassem de modo inibitório (e não estimulatório) da via biossintética das ligninas, enquanto a luz teria um papel fundamental na indução desse processo. Confirma-se nesse trabalho que ambos estimulam a via biossintética ligada a lignificação e ainda, que os teores de lignina não são o reflexo direto do número de células, mas também que as GAs (GA<sub>3</sub>) promovem o espessamento da parede da fibra e maior conteúdo de lignina por célula incluindo também o ambiente sombreado (Figuras 22 e 23). Estes resultados indicam que, possivelmente algum mecanismo ligado à sinalização promovida por GAs atue na estimulação de genes/proteínas da rota dos precursores da lignina de modo independente da luz ou ainda as GAs podem substituir o efeito promovido pela luz na estimulação destes processos. Nesse sentido, fatores transcricionais do tipo MYB, o MYB58 e MYB63 de *Arabidopsis* são especificamente expressos nas fibras e elementos de vaso e desencadeiam o espessamento da parede celular



via deposição de lignina. No entanto, não há evidências até o momento de que esses fatores transcricionais são estimulados por GAs ou por luz (ZHOU et al., 2009).

De forma bem conhecida (YAMAGUCHI; KAMIYA, 2000; SARKAR et al., 2004; DAYAN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; MARTINS, 2013; GUO et al., 2015; HEDDEN; THOMAS, 2016; ZHU et al., 2016) a aplicação de GA<sub>3</sub> é capaz de reverter o efeito do inibidor PBZ, restaurando o fenótipo das plantas (RIBEIRO et al., 2012; COHEN et al., 2013; GUO et al., 2015). Evidenciou-se neste trabalho que a restauração do fenótipo com maior acúmulo de MS, indução da atividade cambial (Figuras 17 e 20), desenvolvimento secundário do caule, maior lignificação dos tecidos e incremento de área foliar nas plantas tratadas com PBZ e suplementadas com GA<sub>3</sub> (tratamentos GA10P e GA100P) (DAYAN et al., 2012). Leva-se em consideração que a análise multivariada (PCA) incorpora todos os dados coletados para uma planta em particular, bem como para as demais repetições e tratamentos; e a luz foi associada ao primeiro fator que discriminou todos os tratamentos de A<sub>IR</sub> com os de B<sub>IR</sub>. Para o PCA2 houve a formação de vários clusters. Inicialmente para PBZ, supostamente para os níveis mais baixos de GAs, em sequência outro contendo o Cont e GA10P, depois um terceiro agrupamento formado pelo GA10 e, por último GA100. Do primeiro ao último supostamente com níveis aumentados das GAs endógenas, particularmente de fácil distinção para as plantas A<sub>IR</sub> cujos níveis endógenos de GAs são menores que às de sombra (KUREPIN et al., 2006, 2007; KUREPIN; PHARIS, 2014). Padrão similar também é encontrado para as plantas de sombra, embora a magnitude dos escores que separam os tratamentos seja levemente menor que as de sol (Figuras 27 e 28). Com base nas evidências descritas há uma resposta crescente em relação aos níveis aumentados de GAs e que a interação entre GAs e a luz é aditiva na indução da lignificação das células. As alterações observadas em níveis estruturais e ultraestruturais do caule fornecem evidências que GAs atuam no metabolismo de síntese e estrutura das paredes celulares (BIEMELT; TSCHERSCH; SONNEWALD, 2004; DAYAN et al., 2010; DIXIT, 2013) assim como em enzimas-chave importantes na extensibilidade da parede celular como  $\alpha$ -expansinas, pectinesterases (RIBEIRO et al., 2012) ou endoglucanases e da biossíntese de lignina como a fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) quanto da construção por xiloglucanos endotransglucosilase/hidrolase (XTHs) (WANG et al., 2015). O estímulo da atividade cambial por meio da ICA, codificada por um gene pectina metiltransferase putativa que, possivelmente, atua como uma moduladora para atividade meristemática do câmbio fascicular e interfascicular controlando mecanismos para regulação do crescimento secundário do caule

(KIM et al., 2016). Sabe-se que GAs modulam a atividade cambial pela ICA (KIM et al., 2016) ou via sinalização foliar (DAYAN et al., 2012) e contribuem de maneira direta para à diferenciação dos tecidos do xilema formando fibras (Figuras 18 e 21) e como consequência a lignificação destes. Ademais, ressalta-se que a interação com o complexo PIF (dependente de luz) leva a degradação das proteínas DELLA permitindo reorganização desencadeando a sinalização celular necessária para indução do crescimento (LI et al., 2016).

Dados aqui apresentados demonstram que as GAs influenciam nos processos de síntese, deposição, construção e modificação da parede celular, conforme já relatado. Em níveis ultraestruturais nós demonstramos de modo inédito que as paredes das fibras do xilema ficaram mais espessadas e lignificadas em função do aumento dos níveis endógenos de GAs (Figuras 22 e 23), enquanto a redução via PBZ promoveu menores teores de lignina tornando-as fibras frágeis e menos resistentes (Figuras 22D e 23D) mas não necessariamente afetando o diâmetro do caule (Figura 3D) (ERIKSSON et al., 2000; BIEMELT; TSCHIRSCH; SONNEWALD, 2004). Cabe ressaltar que não há indícios de alterações em relação ao número ou espessamento da parede dos elementos de vaso em resposta aos níveis de GAs (Figuras 15A, 22 e 23), que efetivamente suportam elevadas tensões para transporte de água e sais minerais no xilema. Evidências histoquímicas ainda indicam que GAs possivelmente modificam também a composição monomérica da lignina em caules (Figura 16 e 19). Segundo o trabalho de Ferreira et al. (2017) no qual utilizou-se testes histoquímicos convencionais (testes de Wiesner e Maule) para detecção de lignina e por análises mais detalhadas com epifluorescência em *N. tabacum* na identificação de ligninas, desvendaram que elementos de vaso possuem monômeros do tipo hidroxifenil (H) ou guaiacil (G) enquanto as fibras do xilema estão presentes às do tipo siringil (S) (FERREIRA et al., 2017). Assim, especula-se que as GAs por estimularem a formação de fibras, também, especificamente, estimulam a formação de lignina rica em monômeros S, mas não as do tipo H ou G encontradas em maior quantidade nos EV. Acredita-se que o gene da F5H (ácido ferúlico 5-hydroxylase), responsável pela conversão de coniferaldeído a 5-OH coniferaldeído e coniferil álcool a 5-OH coniferil álcool e especificamente envolvida na formação de lignina tipo S (monoligno tipo S) (ZHAO; DIXON, 2011) possa ter sido estimulado pelas GAs e também pela luz uma vez que apenas as fibras interfasciculares apresentaram paredes espessadas e mais lignificadas.

Salienta-se que não houve alteração nem no número e nem na espessura das paredes dos EV (Figuras 22 e 23) nesse trabalho. As variações sutis na coloração entre elementos de

vaso e fibras, bem como entre tratamentos aplicados indicam que a razão dos monômeros H, G e S seria alterada em função dos níveis de GAs e luz.

Não há evidências experimentais nesse trabalho que os tratamentos aplicados diminuíssem os teores de celulose no caule com base na dupla coloração com Calcofluor Bright White 28 (celulose; visualizado em azul) e Auramina O (lignina, visualizado em amarelo) (Figuras 17 e 20). A diminuição dos teores de celulose e hemicelulose poderia criar um aumento de espaço entre as microfibrilas promovendo um estímulo da deposição de lignina no espaço aumentado. Acredita-se que a lignina é depositada nesses espaços por meio de ligações cruzadas entre a celulose e hemicelulose (TOKUNAGA; UCHIMURA; SATO, 2006). As evidências experimentais indicam que o efeito da luz e, principalmente, das GAs resultam do estímulo da formação de precursores e ativa a lignificação das paredes celulares particularmente das fibras. Nos extremos experimentais referentes aos níveis endógenos de GAs, seja pelos menores teores via aplicação de PBZ quanto pelos maiores valores com pulverização de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  a fluorescência azul resultante da visualização de parede celular de composição celulosítica das células do parênquima cortical e medular se mostram similares para os diferentes níveis de GAs bem como para a diferença de irradiância no ambiente de cultivo. Conclui-se a partir dessas evidências que o aumento na lignificação não é uma resposta condicional à redução dos teores de celulose/hemicelulose e sim um reflexo direto da indução da rota biossintética da lignina e de seus precursores.

A medida que a formação da parede celular se processa a orientação dos microtúbulos devem seguir maior grau de organização e orientação, fornecendo espaços entre as microfibrilas para deposição de celulose e lignina. Apenas uma escassa literatura respalda o papel das GAs nesses mecanismos (DIXIT, 2013; LOCASCIO; BLÁZQUEZ; ALABADÍ, 2013) no qual as proteínas DELLA interagem diretamente com o complexo Prefoldina (PFD) regulando assim a disponibilidade de subunidades de tubulina de uma forma totalmente dependente de GAs e luz. O modelo desenvolvido por DIXIT (2013) indica que o aumento da disponibilidade de GAs correlaciona-se com maior disponibilidade de microtúbulos e seu alinhamento de modo transversal permitindo assim o preenchimento dos espaços com lignina. De modo oposto menor concentração de GAs direcionam as matrizes de microtúbulos corticais à maior desorganização e uma rede menos densa, presumivelmente porque os níveis de tubulina são limitantes (DIXIT, 2013) reduzindo assim os espaços à serem preenchidos por lignina. Em resposta ao modelo proposto e baseado na atuação aditiva poderiam explicar os

maiores teores de lignina quantificados que seriam consequência do maior número de fibras e com paredes mais espessadas do xilema por sua vez induzidos diretamente pela ação das GAs.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados fornecem suporte para a hipótese de que as GAs são capazes de promover alterações fenotípicas em ambiente de alta e de baixa irradiâncias pelo desencadeamento de respostas diferentes ao ganho de biomassa, captura de luz, eficiência energética, estruturas anatômicas e lignificação das plantas de tabaco. O efeito promovido por GA<sub>3</sub> e a alta disponibilidade de luz atua de modo aditivo restaurando completamente as restrições impostas por PBZ para o aumento das taxas de crescimento, incremento das fibras do xilema e teores de lignina das plantas. De modo semelhante em baixa irradiância, o GA<sub>3</sub> promove alterações no acúmulo de MS, porém com início de lignificação dos tecidos indicando um efeito parcial na superação das restrições impostas por PBZ e luz.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKGUL, M.; ÇOPUR, Y.; TEMIZ, S. A comparison of kraft and kraft-sodium borohydrate brutia pine pulps. **Building and Environment**, v. 42, n. 7, p. 2586–2590, 2007.
- ALABADÍ, D.; GALLEGO-BARTOLOMÉ, J.; ORLANDO, L.; GARCÍA-CÁRCEL, L.; RUBIO, V.; MARTÍNEZ, C.; FRIGERIO, M.; IGLESIAS-PEDRAZ, J. M.; ESPINOSA, A.; DENG, X. W.; BLÁZQUEZ, M. A. Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. **The Plant Journal**, v. 53, n. 2, p. 324–335, 2008.
- ALONI, R. Differentiation of vascular tissues. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 179–204, 1987.
- ALONI, R. Role of hormones in controlling vascular differentiation and the mechanism of lateral root initiation. **Planta**, v. 238, n. 5, p. 819–830, 2013.
- ALONI, R.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. **Plant Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1743–1747, 1990.
- ANDERSSON-GUNNERÅS, S.; MELLEROWICZ, E. J.; LOVE, J.; SEGERMAN, B.; OHMIYA, Y.; COUTINHO, P. M.; NILSSON, P.; HENRISSAT, B.; MORITZ, T.; SUNDBERG, B. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: Global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. **Plant Journal**, v. 45, n. 2, p. 144–165, 2006.
- ANTUNES, W. C.; MENEZES DALOSO, D. de; PINHEIRO, D. P.; WILLIAMS, T. C. R.; LOUREIRO, M. E. Guard cell-specific down-regulation of the sucrose transporter SUT1 leads to improved water use efficiency and reveals the interplay between carbohydrate metabolism and K<sup>+</sup> accumulation in the regulation of stomatal opening. **Environmental and Experimental Botany**, v. 135, p. 73–85, 2017.
- BIEMELT, S.; TSCHIERSCH, H.; SONNEWALD, U. Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 254–265, 2004.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2. ed. New York: Wiley, 2015.
- CARRIELLO, F.; MIRANDA, F. G.; PONZONI, F. J.; CARDOSO, P. de A.; MARTINS, S. P. Uso da transmitância na caracterização espectral de folhas verdes. **Anais XI SBSR**, p. 2451–2457, 2003.
- CHEN, E.-L.; CHEN, Y.-A.; CHEN, L.-M.; LIU, Z.-H. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 439–444, 2002.

COHEN, Y.; ALONI, D. D.; ADUR, U.; HAZON, H.; KLEIN, J. D. Characterization of growth-retardant effects on vegetative growth of date palm seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 3, p. 533–541, 2013.

DAVIÈRE, J.-M.; ACHARD, P. Gibberellin signaling in plants. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 6, p. 1147–51, 2013.

DAVIÈRE, J. M.; DE LUCAS, M.; PRAT, S. Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 18, n. 4, p. 295–303, 2008.

DAVIES, P. J. **Gibberellin biosynthesis and inactivation**. 3. ed. New York: Springer, 2010.

DAYAN, J.; SCHWARZKOPF, M.; AVNI, A.; ALONI, R. Enhancing plant growth and fiber production by silencing GA2-oxidase. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 4, p. 425–435, 2010.

DAYAN, J.; VORONIN, N.; GONG, F.; SUN, T.; HEDDEN, P.; FROMM, H.; ALONI, R. Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. **The Plant Cell**, v. 24, n. 1, p. 66–79, 2012.

DIXIT, R. Plant cytoskeleton: DELLA connects gibberellins to microtubules. **Current Biology**, v. 23, n. 11, p. R479–R481, 2013.

ERIKSSON, M. E.; ISRAELSSON, M.; OLSSON, O.; MORITZ, T. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 784–788, 2000.

FABIAN, T.; LORBIECKE, R.; UMEDA, M.; SAUTER, M. The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. **Planta**, v. 211, n. 3, p. 376–383, 2000.

FERREIRA, B. G.; FALCIONI, R.; GUEDES, L. M.; AVRITZER, S. C.; ANTUNES, W. C.; SOUZA, L. A.; ISAIAS, R. M. S. Preventing false negatives for histochemical detection of phenolics and lignins in PEG-embedded plant tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 65, n. 2, p. 105–116, 2017.

FOLTA, K. M.; MARUHNICH, S. A. Green light: A signal to slow down or stop. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 12, p. 3099–3111, 2007.

GIVNISH, T. J. Adaptation to Sun and shade: A whole-plant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 63–92, 1988.

GUO, H.; WANG, Y.; LIU, H.; HU, P.; JIA, Y.; ZHANG, C.; WANG, Y.; GU, S.; YANG, C.; WANG, C. Exogenous GA3 application enhances xylem development and induces the expression of secondary wall biosynthesis related genes in *Betula platyphylla*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22960–22975, 2015.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 523–530, 2000.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A century of gibberellin research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 740–760, 2015.

HEDDEN, P.; THOMAS, S. G. **Annual plant review: the gibberellins vol. 49**. 1. ed. New York: Wiley Blackwell, 2016.

HIROSE, T. Development of the Monsi–Saeki theory on canopy structure and function. **Annals of Botany**, v. 95, p. 483–494, 2005.

HOFFMANN, W. A.; POORTER, H. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. **Annals of Botany**, v. 90, n. 1, p. 37–42, 2002.

HUNT, R. **Basic growth analysis**. 1. ed. London: Unwin Hyman, 1990.

IBRAHIM, L. An Investigation of Wound Healing in Sugar Beet Roots Using Light and Fluorescence Microscopy. **Annals of Botany**, v. 88, n. 2, p. 313–320, 2001.

IKEMATSU, S.; TASAKA, M.; TORII, K. U.; UCHIDA, N. ERECTA-family receptor kinase genes redundantly prevent premature progression of secondary growth in the Arabidopsis hypocotyl. **New Phytologist**, 2016.

INADA, S.; SHIMMEN, T. Regulation of elongation growth by gibberellin in root segments of Lemna minor. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 6, p. 932–939, 2000.

ISRAELSSON, M. **Gibberellin homeostasis and biosynthesis in relation to shoot growth in hybrid aspen**. 2004. Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1940.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137A, 1965.

KIERNAN, J. A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. **Microscopy Today**, v. 12, p. 8–12, 2000.

KIM, H.; KOJIMA, M.; CHOI, D.; PARK, S.; MATSUI, M.; SAKAKIBARA, H.; HWANG, I. Overexpression of INCREASED CAMBIAL ACTIVITY, a putative methyltransferase, increases cambial activity and plant growth. **Journal of Integrative Plant Biology**, 2016.

KIMURA, M.; YAMAMOTO, Y. Y.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATO, M.; ABE, T.; YOSHIDA, S.; MANABE, K.; SHINOZAKI, K.; MATSUI, M. Identification of Arabidopsis genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 2, p. 226–233, 2003.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. 2. ed. São Paulo: São Paulo, 1996.

KRAUS, J. E.; DE SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H.; CASTRO, N. M.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic & histochemistry**, v. 73, n. 5, p. 235–243, 1998.



KUREPIN, L. V.; EMERY, R. J. N.; PHARIS, R. P.; REID, D. M. The interaction of light quality and irradiance with gibberellins, cytokinins and auxin in regulating growth of *Helianthus annuus* hypocotyls. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 2, p. 147–155, 2007.

KUREPIN, L. V.; PHARIS, R. P. Light signaling and the phytohormonal regulation of shoot growth. **Plant Science**, v. 229, p. 280–289, 2014.

KUREPIN, L. V.; PHARIS, R. P.; REID, D. M.; CHINNAPPA, C. C. Involvement of gibberellins in the stem elongation of sun and shade ecotypes of *Stellaria longipes* that is induced by low light irradiance. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 7, p. 1319–1328, 2006.

LARTER, M.; BRODRIBB, TIMOTHY, J.; PFAUTSCH, S.; BURLETT, R.; COCHARD, H.; DELZON, S. Extreme aridity pushes trees to their physical limits. **Plant Physiology**, v. 168, n. July, p. 804–807, 2015.

LAU, O. S.; DENG, X. W. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 5, p. 571–577, 2010.

LI, K.; YU, R.; FAN, L.-M.; WEI, N.; CHEN, H.; DENG, X. W. DELLA-mediated PIF degradation contributes to coordination of light and gibberellin signalling in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, v. 7, n. May, p. 11868, 2016.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LOCASCIO, A.; BLÁZQUEZ, M. A.; ALABADÍ, D. Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. **Current Biology**, v. 23, n. 9, p. 804–809, 2013.

MARTINEZ-VILALTA, J.; POYATOS, R.; AGUADE, D.; RETANA, J.; MENCUCCHINI, M. A new look at water transport regulation in plants. **New Phytologist**, v. 204, n. 1, p. 105–115, 2014.

MARTINS, A. O. **Impactos ecofisiológicos e metabólitos da alteração nos níveis de giberelina em tomate**. 2013. Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2013.

MOREIRA-VILAR, F. C.; SIQUEIRA-SOARES, R. D. C.; FINGER-TEIXEIRA, A.; DE OLIVEIRA, D. M.; FERRO, A. P.; DA ROCHA, G. J.; FERRARESE, M. D. L. L.; DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE-FILHO, O. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. e110000, 2014.

MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA, J.; DORNELAS, M. C.; MAZZAFERA, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 4, p. 360–376, 2010.

NAGEL, O. W.; LAMBERS, H. Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 7, p. 883–891, 2002.

NIINEMETS, Ü. Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1052–1071, 2007.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964.

OLSZEWSKI, N.; SUN, T. P.; GUBLER, F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. **The Plant Cell**, v. 14, n. s, p. 61–80, 2002.

PAIVA, J. G. A. De; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 2, p. 257–264, 2006.

PEARCY, R. W. Responses of plants to heterogeneous light environments. In: PUGNAIRE, F.; VALLADARES, F. (Ed.). **Functional Plant Ecology**. 2. ed. New York: CRC Press, 2007. p. 213–258.

PUGNAIRE, F.; VALLADARES, F. **Functional plant ecology**. 2. ed. New York: CRC Press, 2007.

RIBEIRO, D. M.; ARAÚJO, W. L.; FERNIE, A. R.; SCHIPPERS, J. H. M.; MUELLER-ROEBER, B. Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2769–2786, 2012.

ROBERTS, L. W.; GAHAN, P.; ALONI, R. **Vascular differentiation and plant growth regulators**. 2. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

ROSS, J.; O'NEILL, D. New interactions between classical plant hormones. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 1, p. 2–3, 2001.

SARKAR, S.; PERRAS, M. R.; FALK, D. E.; ZHANG, R.; PHARIS, R. P.; FLETCHER, R. A. Relationship between gibberellins, height, and stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 2, p. 125–135, 2004.

SAUTER, M.; KENDE, H. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. **Planta**, v. 188, n. 3, p. 362–8, 1992.

SCHOPFER, P.; LAPIERRE, C.; NOLTE, T. Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: Mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 1, p. 83–92, 2001.

SILVA, P. E. M.; CAVATTE, P. C.; MORAIS, L. E.; MEDINA, E. F.; DAMATTA, F. M. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: Implications for breeding aimed at improving drought tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 49–57, 2013.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 2–3, p. 337–354, 2002.

SOUZA, L. A.; ROSA, S. M.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; RODELLA, R. A.; ROCHA, D. C.; LOLIS, M. I. G. A. **Morfologia e anatomia vegetal: técnicas e práticas**. 2. ed. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2005.

SRIVASTAVA, L. **Plant growth and development: hormones and environment**. 1. ed. New York: Academic Press, 2002.

SYROS, T. D.; YUPSANIS, T. A.; ECONOMOU, A. S. Expression of peroxidases during seedling growth in *Ebenus Cretica* L. as affected by light and temperature treatments. **Plant Growth Regulation**, v. 46, n. 2, p. 143–151, 2005.

THETFORD, M.; WARREN, S. L.; BLAZICH, F. A.; THOMAS, J. F. Response of *forsythia xintermedia spectabilis* to uniconazole . 2. Leaf and stem anatomy, chlorophyll, and photosynthesis. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 6, p. 983–988, 1995.

TOKUNAGA, N.; UCHIMURA, N.; SATO, Y. Involvement of gibberellin in tracheary element differentiation and lignification in *Zinnia elegans* xylogenic culture. **Protoplasma**, v. 228, n. 4, p. 179–187, 2006.

UEGUCHI-TANAKA, M.; NAKAJIMA, M.; MOTOYUKI, A.; MATSUOKA, M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 183–198, 2007.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VANHOLME, R.; MORREEL, K.; DARRAH, C.; OYARCE, P.; GRABBER, J. H.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. **New Phytologist**, v. 196, n. 4, p. 978–1000, 2012.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.

VOOREND, W.; NELISSEN, H.; VANHOLME, R.; DE VliegHER, A.; VAN BREUSEGEM, F.; BOERJAN, W.; ROLDÁN-RUIZ, I.; MUYLLE, H.; INZÉ, D. Overexpression of GA20-OXIDASE1 impacts plant height, biomass allocation and saccharification efficiency in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 3, p. 997–1007, 2016.

WADA, M.; SHIMAZAKI, K.; IINO, M. **Light sensing in plants**. 1. ed. Japan: Springer Japan, 2005.

WANG, G.-L.; QUE, F.; XU, Z.-S.; WANG, F.; XIONG, A.-S. Exogenous gibberellin altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. **BMC Plant Biology**, v. 290, n. 15, p. 1–12, 2015.

WANG, Y.; FOLTA, K. M. Contributions of green light to plant growth and development. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 1, p. 70–78, 2013.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 225–251, 2008.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 3, p. 251–257, 2000.

YANG, S. L.; ZHANG, X. N.; LU, G. L.; WANG, C. R.; WANG, R. Regulation of gibberellin on gene expressions related with the lignin biosynthesis in “Wangkumbae” pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 2, p. 127–134, 2015.

YOON, J.; CHOI, H.; AN, G. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 11, p. 902–912, 2015.

YUE, J. H.; ZHANG, D.; REN, L.; SHEN, X. H. Gibberellin and auxin signals control scape cell elongation and proliferation in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*. **Journal of Plant Biology**, v. 59, n. 4, p. 358–368, 2016.

ZHAO, Q.; DIXON, R. A. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: More complex than we thought? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 4, p. 227–233, 2011.

ZHONG, R.; YE, Z. H. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. **Plant Signaling Behavior**, v. 4, n. 11, p. 1028–1034, 2009.

ZHOU, J.; LEE, C.; ZHONG, R.; YE, Z.-H. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 1, p. 248–66, 2009.

ZHU, X.; CHAI, M.; LI, Y.; SUN, M.; ZHANG, J.; SUN, G.; JIANG, C.; SHI, L. Global transcriptome profiling analysis of inhibitory effects of paclobutrazol on leaf growth in lily (*Lilium longiflorum*-Asiatic hybrid). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. April, p. 01–14, 2016.