

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RENATA COSTA SINZKER

**EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE AS ENZIMAS DA VIA DOS  
FENILPROPANOIDES EM MILHO**

MARINGÁ

2018

RENATA COSTA SINZKER

**EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE AS ENZIMAS DA VIA DOS  
FENILPROPANOIDES EM MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Wanderley Dantas dos Santos

MARINGÁ

2018

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

S618e Sinzker, Renata Costa  
Efeitos do estresse salino sobre as enzimas da  
via dos fenilpropanoides em milho / Renata Costa  
Sinzker. -- Maringá, 2018.  
35 f. : il. color., figs.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos  
Santos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciência Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Lignina. 2. Lignina - Milho. 3. Parede  
celular. 4. Estresse salino. 4. Milho -  
Fenilpropanoides - Enzimas. Santos, Wanderley Dantas  
dos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.  
Centro de Ciência Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 21.ed.571.2

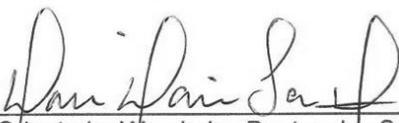
ESCL-9/1202

RENATA COSTA SINZKER

**EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE AS ENZIMAS DA VIA DOS  
FENILPROPANOIDES EM MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas”.

Aprovado em: 07/06/2018

  
Prof. Orientador Wanderley Dantas dos Santos  
Universidade Estadual de Maringá

  
Prof. Graciene de Souza Bido  
Centro Universitário de Maringá

  
Prof. Rogério Marchiosi  
Universidade Estadual de Maringá

## BIOGRAFIA

Renata Costa Sinzker nasceu em Curitiba (PR) em 02 de agosto de 1989. Possui graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura pela Unicesumar (2012), e graduação em Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá (2016). Iniciou o mestrado no programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) também pela Universidade Estadual de Maringá em março de 2016.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta do artigo científico “Efeitos do estresse salino sobre as enzimas da via dos fenilpropanoides em milho”, que avalia as alterações ocorridas nos níveis de lignificação, feruloilação e das atividades enzimáticas de enzimas da via dos fenilpropanoides. Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, o artigo será redigido de acordo com a seguinte revista:

Sinzker, R. C., Oliveira, D. M., Mota, T. R., Salatta, F. V., Ferrarese-Filho, O., dos Santos, W. D. Efeitos do estresse salino sobre as enzimas da via dos fenilpropanoides em milho. *Plant Physiology and Biochemistry* (JCR = 2,724; Qualis B1).

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** Materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de celulose, hemicelulose, pectina e lignina. A via de fenilpropanóides envolve a participação de várias enzimas para a formação das unidades monoméricas da lignina: *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil. Tais unidades são exportadas para a parede celular e polimerizadas formando a parede secundária. A restrição ao acesso dos polissacarídeos da parede celular ocorre principalmente devido à estrutura da lignina. Compreender como o mecanismo de síntese de lignina induzida por condições de estresse funciona pode indicar caminhos de como sua síntese pode ser controlada de modo a favorecer a resposta metabólica em situações adversas. O ácido ferúlico é um componente importante na organização da parede celular, pois é capaz de se polimerizar com outros compostos fenólicos interligando polímeros da parede celular como hemiceluloses e pectinas com a lignina. Mais de uma reação na via dos fenilpropanóides está envolvida na síntese de ácido ferúlico. Aldeído desidrogenases (ALDHs) são descritas por atuarem em processos de tolerância do vegetal ao estresse abiótico, participando no mecanismo de ajustamento osmótico e no processo de desintoxicação celular. Por sua vez, a enzima cafeato 3-*O*-metiltransferase (COMT) foi relatada como sendo altamente responsiva ao tratamento salino. A salinização é um dos problemas mais persistentes e prejudiciais na agricultura. Além de perdas instantâneas na produtividade, a salinização é uma ameaça permanente à fertilidade das culturas, podendo levar à desertificação do solo. A salinidade afeta negativamente todas as fases de desenvolvimento da planta, induz a senescência prematura de folhas e acarreta significativas perdas de rendimento. Ocorre, primariamente, uma toxicidade osmótica e iônica nas células. Os efeitos secundários incluem aumento do estresse oxidativo, danos aos componentes celulares e disfunção metabólica. O objetivo do trabalho foi cultivar plantas de milho em condições de estresse salino (NaCl 200 mM) a fim de investigar o papel das enzimas: 4-coenzima A ligase (4-CL), feruloil coenzima A ligase (FCL), cafeato 3-*O*-metiltransferase (COMT) e coniferaldeído desidrogenase (CALDH) na resposta ao estresse, avaliando também a alteração nos níveis de estresse oxidativo, feruloilação e lignificação das raízes das plantas cultivadas.

**MÉTODOS:** Plantas de milho foram cultivadas em 0 (Controle) e NaCl 200 mM por 3 e 17 dias após a germinação (DAG). Foram realizadas análises biométricas de crescimento, biomassa fresca, biomassa seca e teor relativo de água. Avaliamos o teor de lignina pelo método de brometo de acetila e a composição monomérica pelo método

de oxidação com nitrobenzeno. As análises enzimáticas das 4-CL e FCL foram realizadas em espectrofotômetro, já as enzimas cafeato COMT e CALDH tiveram suas atividades avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os teores de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico também foram quantificados em HPLC. Para as técnicas de avaliação de sequestro de radicais livres (DPPH) e avaliação da peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA) foram utilizados o espectrofotômetro.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Ao avaliarmos o dano oxidativo causado pelo cultivo na presença de NaCl 200 mM observamos um aumento de cerca de 120% no teor de malondialdeído nas raízes de 3 e 17 DAG, quando comparado com raízes de plantas controle. Utilizando a técnica de DPPH constatamos que as raízes das plantas de 3-DAG tratadas com NaCl 200 mM tiveram uma redução de 14%, enquanto as plantas de 17-DAG apresentaram um aumento de 136% na capacidade de sequestro de radicais livres. O teor de fenólicos totais foi reduzido em cerca de 13% nas raízes das plantas de 3-DAG cultivadas sob o estresse salino, já nas plantas de 17-DAG observou-se um aumento de 45%. Na concentração de 200 mM, o NaCl afetou o crescimento e o teor de lignina das raízes de milho. Plantas cultivadas por 3-DAG tiveram redução de 62,5% no crescimento e uma redução de mais de 68% foi observada nas plantas de 17-DAG. O teor de lignina das plantas submetidas ao estresse salino por 3 e 17-DAG aumentou em 31% e 18%, respectivamente, quando comparadas aos controles. O estresse também alterou a composição monomérica das raízes de 3 e 17-DAG das plantas tratadas, elevando a razão S/G em 70% e 44%, respectivamente. Nas raízes de plantas de 3-DAG as atividades 4-CL e FCL apresentaram uma redução de aproximadamente 50% na sua atividade. Já no cultivo por 17-DAG, sob estresse salino, a redução foi de 40% para 4-CL e 16% para FCL. Um aumento significativo de 134% e 321% no conteúdo de ácido ferúlico livre, foi observado nas plantas de 3 e 17-DAG, respectivamente. Por sua vez, o ácido *p*-cumárico livre apresentou um aumento significativo de 110% apenas nas plantas de 17-DAG. Analisando os teores dos ácidos esterificados à parede celular, observamos uma redução no conteúdo de ácido ferúlico em 25% em ambos os tempos de tratamento, e uma redução de 25% do ácido *p*-cumárico, apenas nas plantas de 3-DAG. Constatamos um aumento de 35% na atividade da CALDH, nas raízes de plantas de 3-DAG, e um aumento de 60% na atividade da CALDH das plantas de 17-DAG. Nas raízes de plantas de 3-DAG, nenhuma alteração foi observada na atividade da COMT. Já nas raízes das plantas de 17-DAG, a enzima COMT teve sua atividade aumentada 128%.

**CONCLUSÃO:** A compreensão das funções de diferentes enzimas da via dos fenilpropanoides pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias moleculares que permitam a obtenção de cultivares agrícolas mais tolerantes às condições de estresse salino. A biossíntese de lignina pode ter sua complexidade aumentada dependendo dos estresses aos quais a planta está exposta. Tal fato pudemos observar com o aumento de 31% e 18% no teor de lignina nas plantas de 3 e 17 dias respectivamente. Ao investigar a contribuição das enzimas, encontramos uma redução de 50% das atividades das enzimas 4-CL e FCL nas plantas de 3 dias, tal fato não implica em uma redução da lignina pois possivelmente a atividade está reduzida como mecanismo para reduzir o teor de pCA e FA esterificados à parede celular, enquanto enzimas intermediárias que, provavelmente, estão ativadas permitem o aumento da lignina total. Já a enzima CALDH teve sua atividade aumentada em 37% nas plantas de 3 dias e em 60% nas de 17 dias, embora não haja informação na literatura que demonstre correlação entre atividade CALDH e lignina, ela pode contribuir aumentando intermediários da via e consequentemente facilitando a polimerização da lignina. Diferentes modelos de estresse podem ser testados para revelar alterações importantes em vias metabólicas como a da síntese de lignina. Investigar o papel de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina pode ajudar a elucidar seu papel no desenvolvimento da resposta metabólica ao estresse salino bem como auxiliar na seleção e modificação de plantas visando a produção de cultivares resistentes, e aumentando sua produtividade mesmo na presença deste crescente problema.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES:** Lignocellulosic materials are mainly composed of cellulose, hemicellulose, lignin, pectin, and lignin. The lignin biosynthesis pathway involves the participation of various enzymes to form the monomeric units of the lignin: *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl. Such units are exported to the cell wall and polymerized forming the secondary wall. The restriction to the access of the cell wall polysaccharides occurs mainly due to the lignin structure. Understanding how the mechanism of lignin synthesis induced by stress conditions works may indicate ways, which its synthesis can be controlled to favor metabolic response in adverse situations. Ferulic acid is an important component in the organization of the cell wall because it is able to polymerize with other phenolic compounds by interconnecting cell wall polymers such as hemicelluloses and pectin with lignin. More than one reaction in the phenylpropanoid pathway is involved in the synthesis of ferulic acid. Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) are described as acting in processes of plant tolerance to abiotic stress, participating in the osmotic adjustment mechanism and in the process of cell detoxification. As well, the enzyme 3-orthomethyl transferase (COMT) has been reported to be highly responsive to salt treatment. Soil salinization is one of the most persistent and harmful problems in agriculture. In addition to instant losses in productivity, salinization is a permanent threat to crop fertility and may lead to soil desertification. Salinity affects all stages of plant development, induces premature senescence of leaves and leads to significant yield losses. It occurs, primarily, by an osmotic and ionic toxicity in the cells. Side effects include increased oxidative stress, damage to cellular components, and metabolic dysfunction. The aim of the study was to cultivate maize plants under saline stress conditions (200 mM) to investigate the role of enzymes 4-CL, FCL, COMT and CALDH in the stress response, also evaluating changes in the levels of oxidative stress, feruloylation and lignification of cultivated plants' roots.

**METHODS:** Maize plants were cultivated for 3 and 17 days after germination (DAG). Biometric analyzes of growth, fresh biomass, dry biomass, and relative water content were performed. We evaluated the lignin content by the acetyl bromide method and the monomer composition by the nitrobenzene oxidation method. The enzymatic analyzes of the enzymes *p*-coumaroyl coenzyme A ligase (4-CL) and feruloyl coenzyme A ligase (FCL) were performed in a spectrophotometer. The enzymes caffeate 3-ortho-transferase (COMT) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CALDH) were evaluated in

high performance liquid chromatography (HPLC). The contents of ferulic acid and p-coumaric acid were also quantified in HPLC. The spectrophotometer was used either for the techniques of evaluation of free radical sequestration (DPPH) and evaluation of lipid peroxidation (malondialdehyde - MDA).

**RESULTS AND DISCUSSION:** When evaluating the oxidative damage caused by the presence of 200 mM NaCl, we observed an increase of about 120% in malondialdehyde content in roots of 3 and 17 DAG, when compared to control plants. Using the DPPH method, we found that the roots of the 3-DAG plants treated with 200 mM NaCl had a reduction of 14%, while 17-DAG plants showed an increase of 136% in the capacity of free radical sequestration. The total phenolic content was reduced by 13% in the roots of the 3-DAG plants grown under the salt stress, whereas in the 17-DAG plants an increase of 45% was observed. At 200 mM concentration, NaCl affected the growth and lignin content of maize roots. Plants grown by 3-DAG had a 62.5% reduction in growth and a reduction of more than 68% was observed in 17-DAG plants. The lignin content of plants submitted to salt stress by 3 and 17-DAG increased by 31% and 18%, respectively, when compared to controls. Stress also altered the monomeric composition of the 3 and 17-DAG roots of the treated plants, raising the S/G ratio by 70% and 44%, respectively. In the roots of 3-DAG plants the isozymes 4-CL and FCL presented a reduction of approximately 50% in their activity. In the 17-DAG culture, under salt stress, the reduction was 40% for 4-CL and 16% for FCL. A significant increase of 134% and 321% in the free ferulic acid content was observed in the 3 and 17-DAG plants, respectively. In turn, free p-coumaric acid showed a significant increase of 110% only in 17-DAG plants. Analyzing the contents of the esterified acids to the cell wall, we observed a reduction in the content of ferulic acid by 25% in both treatment times, and a reduction of 25% of p-coumaric acid, only in 3-DAG plants. We found a 35% increase in CALDH activity in roots of 3-DAG plants, and a 60% increase in CALDH activity of 17-DAG plants. In the roots of 3-DAG plants, no change was observed in COMT activity. In the roots of the 17-DAG plants, the enzyme COMT increased its activity by 128%.

**CONCLUSION:** Understanding the functions of different enzymes in the phenylpropanoid pathway can help the development of molecular strategies that allow the cultivation of more tolerant agricultural cultivars under stress conditions. Lignin biosynthesis may have increased complexity depending on the stresses to which the plant is exposed. This fact can be observed with the increase of 31% and 18% in lignin

content in plants of 3 and 17 days respectively. When investigating the contribution of the enzymes, we found a reduction of 50% of the activities of the 4-CL and FCL enzymes in the 3-day plants, this fact does not imply a reduction of the lignin because possibly the activity is reduced as a mechanism to reduce the content of pCA and FA esterified to the cell wall, while intermediate enzymes that are probably activated allow total lignin increase. On the other hand, the enzyme CALDH increased its activity by 37% in 3-day plants and by 60% in 17-day plants, although there is no information in the literature that demonstrates a correlation between CALDH and lignin activity its increase can led to a facilitated polymerization of lignin. Different stress models can be tested to reveal important changes in metabolic pathways such as lignin synthesis. Investigating the role of enzymes involved in lignin biosynthesis may help to elucidate their role in the development of the metabolic response to saline stress as well as to assist in the selection and modification of plants aiming the production of resistant cultivars and increasing their productivity even in the presence of this relevant problem.

## RESUMO

A parede celular das plantas é formada por polímeros como a celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Alterações na composição e no conteúdo de lignina, presente na parede secundária de tecidos de sustentação e proteção, estão frequentemente associadas a processos de defesa contra estresses bióticos e abióticos. Por participarem da biossíntese de lignina de diferentes ácidos hidroxicinâmicos, as enzimas da via dos fenilpropanoides são importantes objetos de estudo do metabolismo relacionado ao estresse. Contudo, pouco se sabe sobre as modulações dos mecanismos moleculares de síntese de lignina e ácidos hidroxicinâmicos provocadas pelo estresse salino. Assim, cultivamos plantas de milho com cloreto de sódio (NaCl 200 mM) por 3 e 17 dias após a germinação e estudamos as alterações na biossíntese de fenilpropanoides a fim de elucidar a contribuição desta via no metabolismo de resposta ao estresse. O teor de lignina aumentou 31% e 18% nas plantas de 3 e 17 dias, respectivamente. Observamos uma redução de 50% das atividades da 4-coenzima A ligase (4-CL) e feruloil coenzima A ligase (FCL) nas plantas de 3 dias; já a atividade da enzima cafeato 3-*O*-metiltransferase (COMT) aumentou 128% nas plantas de 17 dias e a enzima coniferaldeído desidrogenase (CALDH) teve sua atividade aumentada em 37% nas plantas de 3 dias e em 60% nas de 17 dias. Para o ácido ferúlico solúvel encontramos um aumento de 134% e 321% nas plantas de 3 e 17-DAG, respectivamente. O modelo de estresse utilizado permitiu avaliarmos as mudanças na lignificação e feruloilação da raízes de milho bem como a contribuição de cada enzima nessas alterações.

**Palavras chave:** lignina, parede celular, NaCl, 4-coenzima A ligase, feruloil coenzima A ligase, cafeato 3-*O*-metiltransferase, coniferaldeído desidrogenase.

## ABSTRACT

Plant cell walls are composed by polymers such as cellulose, hemicellulose, pectin and lignin. Changes in the composition and content of lignin, present in the secondary wall of supporting and protective tissues, are often associated with defense processes against biotic and abiotic stresses. Due to the production of lignin and the different hydroxycinnamic acids, the enzymes of the phenylpropanoid pathway become important targets of stress-related metabolism. However, not much is known about the modulations of the mechanisms synthesis of lignin and under salt stress. Thus, we cultivated maize plants with sodium chloride (NaCl 200 mM) for 3 and 17 days after germination and evaluated the changes in the biosynthesis of phenylpropanoids in order to elucidate the contribution of this pathway in the metabolism of stress response. The lignin content increased 31% and 18% in the 3 and 17 day plants, respectively. We observed a 50% reduction in the activities of 4-coenzyme A ligase (4-CL) and feruloyl coenzyme A ligase (FCL) in 3-day plants; (COMT) increased 128% in 17-day plants and the enzyme coniferaldehyde dehydrogenase (CALDH) increased its activity by 37% in 3-day plants and 60% in 17-day plants. For soluble ferulic acid we found an increase of 134% and 321% in plants of 3 and 17-DAG, respectively. This stress model used allowed us to evaluate the changes in the lignification and feruloylation in maize roots as well as the contribution of each enzyme in these alterations.

**Keywords:** lignin, cell wall, NaCl, 4-coenzyme A ligase, caffeate 3-*O*-methyl transferase, feruloyl coenzyme A ligase, coniferaldehyde dehydrogenase

**LISTA DE ABREVIATURAS**

4-CL – 4-coenzima A ligase

CALDH – coniferaldeído desidrogenase

COMT – cafeato 3-*O*-metiltransferase

DAG – dias após a germinação

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$

DTT – ditioneitol,  $C_4H_{10}O_2S_2$

EPM – erro padrão da média

FA – ácido ferúlico

FCL – feruloil coenzima A ligase

G – monômero G, guaiacil monolignol

H – monômero H, *p*-hidroxifenil monolignol

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

pCA – ácido *p*-cumárico

PAL – fenilalanina amônia-liase

PF – peso fresco

PS – peso seco

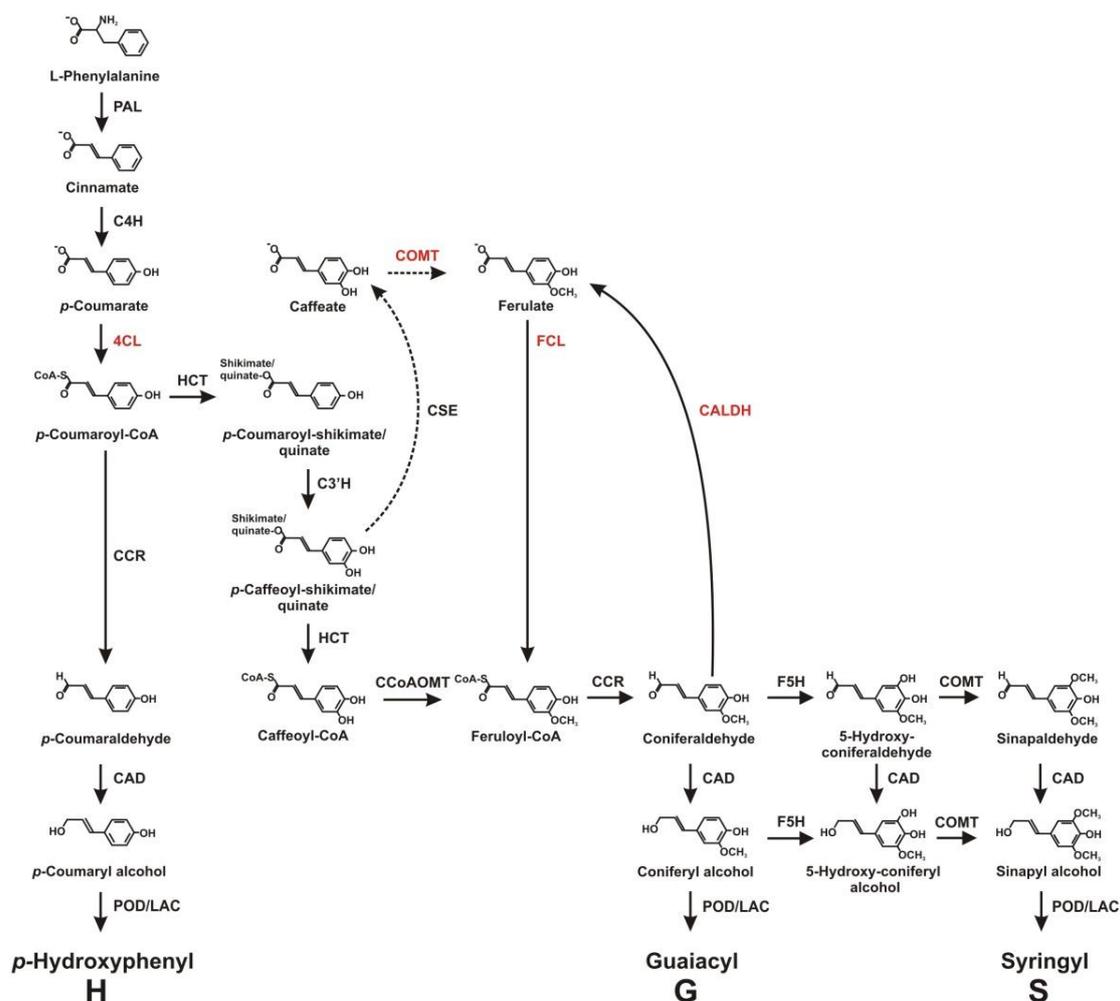
S – monômero S, siringil monolignol

## 1. Introdução

### 1.1. Lignina

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de celulose, hemicelulose, pectina e lignina (Carpita et al., 2001). A celulose é um homopolissacarídeo composto por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranoose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  (Kumar et al., 2008). As hemiceluloses são heteropolissacarídeos constituídos por pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glucose, D-galactose), ácidos urônicos e grupos acetil (Buckeridge et al., 2010). A lignina é um polímero aromático formado principalmente a partir do acoplamento oxidativo de moléculas de 4-hidroxifenilpropanoides. Os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico são os principais componentes da lignina, eles produzem respectivamente os monômeros *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) quando incorporados no polímero de lignina e diferem uns dos outros em seu grau de metoxilação no anel aromático (Boerjan et al., 2003; Vanholme et al., 2010).

A biossíntese de lignina envolve a participação de diferentes enzimas e inicia-se com a desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Em seguida ocorrem sucessivas reações de hidroxilação no anel aromático, seguidas de *O*-metilação fenólica e conversão da carboxila da cadeia lateral em um grupo alcoólico (Figura 1) (Boerjan et al., 2003; Vanholme et al., 2010). Destacamos neste trabalho as enzimas 4-coenzima A ligase (4-CL) e feruloil coenzima A ligase (FCL) que são responsáveis pela ativação do ácido cumárico e do ácido ferúlico, respectivamente; a enzima cafeato 3-*O*-metiltransferase (COMT) que teve sua atividade 3-*O*-metiltransferase medida sobre o substrato ácido cafeico e a enzima coniferaldeído desidrogenase (CALDH) que pode oxidar coniferaldeído diretamente a ácido ferúlico e este por sua vez pode ser exportado para a parede celular atuando como antioxidante e protetor contra radiações ultravioletas (Oliveira et al., 2015).



**Figura 1** – Visão simplificada da via de fenilpropanoides em plantas. Estão destacadas em vermelho as enzimas avaliadas neste trabalho, 4-CL, FCL, COMT e CALDH. As linhas tracejadas indicam reações ainda não comprovadas em gramíneas.

Em células que apresentam parede celular secundária, os monômeros de lignina são exportados para a parede celular por meio de vesículas secretoras e, posteriormente, oxidados por lacases ou peroxidases formando o polímero de lignina. Diferentes tipos celulares biossintetizam formas distintas de matrizes poliméricas lignificadas, visando realizar funções fisiológicas específicas, como por exemplo, para condução de água e suportar as forças de compressão nos tecidos de suporte (Anterola, Lewis, 2002). A estrutura da lignina varia em diferentes tipos de plantas, células e estádios de desenvolvimento (Mottiar et al., 2016). De maneira geral gimnospermas possuem a lignina da parede secundária traqueal rica em guaiacil enquanto as paredes secundárias das fibras de angiospermas são ricas em guaiacil-siringil (Anterola, Lewis, 2002).

Plantas cultivadas em diferentes tipos de estresse podem ter seu perfil metabólico alterado, aumentando a produção de lignina, de compostos fenólicos e de enzimas antioxidantes. Tais respostas refletem uma plasticidade metabólica gerada em resposta às mudanças enfrentadas tanto em função do desenvolvimento, quanto do estresse a que são submetidas (Sun et al., 2016).

A restrição ao acesso de agentes que degradem os polissacarídeos da parede celular, tais como enzimas hidrolíticas e fungos patogênicos, ocorre devido à estrutura da lignina que além de seus monômeros constituintes conta ainda com a polimerização de compostos fenólicos interligando-a aos polímeros da parede celular como hemiceluloses e pectinas, formando um complexo lignina-hemicelulose-celulose (Chen, Dixon, 2007, Tronchet et al., 2010). A estrutura da lignina é um reflexo dos monômeros disponíveis durante sua polimerização e a prevalência de diferentes tipos de ligações é um dos principais fatores determinantes para a resiliência química (Mottiar et al., 2016). Pesquisas em sistemas biológicos revelam que perturbações na biossíntese de lignina têm consequências amplas na regulação da própria via e em outras vias metabólicas (Vanholme et al., 2008). Compreender como esta rede funciona em resposta a situações de estresse pode indicar caminhos de como a síntese de lignina pode ser controlada de modo a favorecer a habilidade de culturas para responder positivamente em situações de estresse.

## *1.2. Ácido Ferúlico*

O ácido ferúlico é um componente importante na organização da parede celular, pois é capaz de se polimerizar com outros compostos fenólicos interligando polímeros da parede celular como hemiceluloses e pectinas com a lignina. Sabendo que a síntese de ácido ferúlico pela via dos fenilpropanóides é redundante, é provável que algumas rotas sejam constitutivas enquanto outras sejam responsivas ao estresse.

Aldeído desidrogenases (ALDHs) são descritas por atuarem em processos de tolerância do vegetal ao estresse abiótico, participando no mecanismo de ajustamento osmótico e no processo de desintoxicação celular (Perozich et al., 1999). Tais enzimas estão envolvidas na conversão de aldeídos nos seus respectivos ácidos carboxílicos, funcionando como "captadores de aldeído", removendo aldeídos reativos gerados durante a degradação oxidativa das membranas lipídicas, um mecanismo conhecido como peroxidação lipídica (Brocker et al, 2013). A superexpressão de genes ALDH

estão relacionados ao aumento da tolerância ao estresse em plantas transgênicas (Zhou et al., 2012). Já foram descritas 13 famílias de ALDH em plantas, sendo a família ALDH2 à qual a CALDH pertence. Estudos de expressão gênica indicam que seu respectivo gene (RF2C) é fortemente expresso em todos os órgãos, e poderia estar ligado à formação da parede celular usando aldeídos da via dos fenilpropanoides como substratos. (Končítíková et al., 2015). Por sua vez, a enzima cafeato 3-*O*-metiltransferase (COMT) foi relatada como sendo altamente responsiva ao tratamento salino (Li et al., 2009). Ambas as enzimas são capazes de produzir ácidos hidroxicinâmicos, um importante composto que contribui para a formação da parede celular, sendo possível que elas estejam relacionadas ao processo de esterificação do ácido ferúlico aos polissacarídeos da parede celular.

### *1.3. Estresse Salino*

Plantas apresentam mudanças específicas na expressão gênica, metabolismo e fisiologia em resposta a diferentes condições de estresse. Para que tais mudanças ocorram, as células vegetais devem ser capazes de detectar os sinais ambientais (Zhu, 2016). Condições ambientais adversas incluem estresses abióticos como seca, excesso de sal e temperatura. Sendo esses os principais fatores que afetam a distribuição geográfica das plantas na natureza, estes fatores limitam a produtividade na agricultura, e, portanto, a segurança alimentar (Fedoroff et al., 2010). A salinização é um dos problemas mais persistentes e prejudiciais na agricultura, principalmente em regiões áridas e semiáridas. Além de perdas instantâneas na produtividade da safra, a salinização é uma ameaça permanente à fertilidade das culturas, podendo, a longo prazo levar à desertificação de águas e solos que se tornam irreversivelmente contaminados (Cabot et al., 2014). A salinidade afeta negativamente todas as fases de desenvolvimento da planta, induzindo a senescência prematura de folhas e acarretando significativas perdas no rendimento das plantas (Munns et al., 2006). A salinização promove, primariamente, uma toxicidade osmótica e iônica nas células. Os efeitos secundários incluem aumento do estresse oxidativo, danos aos componentes celulares – como membranas, lipídios, proteínas e outros – e à disfunção metabólica (Zhu, 2016).

Análises histoquímicas e bioquímicas demonstram que o aumento na lignina é parte da reação vegetal ao estresse salino. Estudos realizados por Neves e colaboradores (2010) relataram um aumento no teor de lignina de 90% após o tratamento de soja com

200 mM de cloreto de sódio (NaCl), além do aumento na atividade de peroxidases e do conteúdo de fenólicos. Plantas de arroz cultivadas em solução salina tiveram a viabilidade de seu pólen afetadas drasticamente, culminando em uma fertilização deficiente e má formação de sementes (Sarhadi et al., 2012). Raízes de plantas de tomate submetidas a estresse salino apresentaram maior lignificação nas células traqueais, possivelmente melhorando o transporte de água, o que permitiria a redução da absorção de íons, compensando a diminuição do fluxo de água e solutos ao longo da via apoplástica (Sánchez-Aguayo et al., 2005).

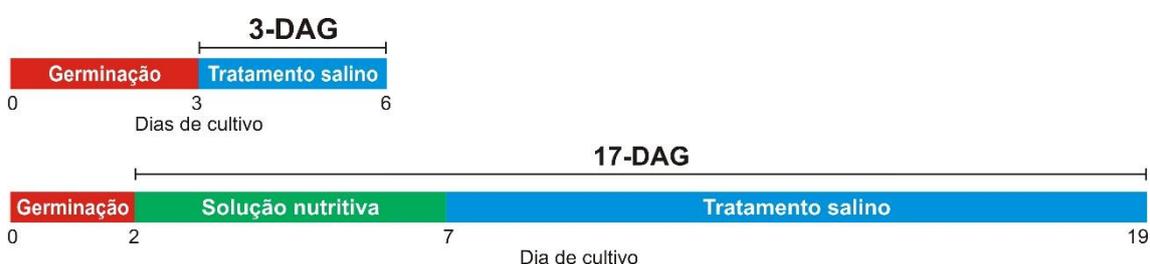
Baseando-nos em diferentes trabalhos disponíveis na literatura, realizamos previamente uma curva de concentração de NaCl (0, 50, 100 e 200 mM) para identificar a concentração na qual o estresse causaria aumento de lignina significativo nas plantas (Salatta, 2017). Desta forma, ficou estabelecido que os ensaios seriam realizados na concentração de 0 (controle) e 200 mM (estresse salino) neste trabalho. A compreensão das funções de diferentes enzimas da via dos fenilpropanoides pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias moleculares que permitam a obtenção de cultivares agrícolas mais tolerantes às condições de estresse salino. O aumento da salinização da terra arável resultará em perdas de até 50% no ano 2050 na extensão de terras utilizáveis para a agricultura. Por isso, entender a tolerância ao estresse salino deve ser uma prioridade de pesquisa nos programas de biotecnologia (Wang et al., 2000). Investigar o papel de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina pode ajudar a elucidar seu papel no desenvolvimento da resposta metabólica ao estresse salino bem como auxiliar na seleção e modificação de plantas visando a produção de cultivares resistentes, aumentando a produtividade dos cultivares, mesmo na presença deste crescente problema agrônômico.

Assim, nesta pesquisa cultivamos plantas de milho por 3 e 17 dias após a germinação (DAG) na ausência e presença de estresse salino (200 mM NaCl) a fim de investigar o papel das enzimas: 4-CL, FCL, COMT e CALDH na resposta ao estresse, avaliando também a alteração no crescimento, nos níveis de estresse oxidativo, feruloilação e lignificação das raízes das plantas cultivadas.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Preparação e cultivo das plântulas: 3 dias após germinação (3-DAG)*

Sementes de milho (cv. IPR 164) foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 5 min, lavadas com água destilada e em seguida colocadas para germinar entre folhas de papéis (Germitest CEL-060), a 25 °C e por 72 horas no escuro. Vinte e cinco plântulas foram selecionadas e acondicionadas em placa de acrílico perfurada suspensa dentro de recipiente de vidro contendo 200 mL de solução nutritiva (Dong et al., 2006) e concentrações de NaCl de 0 (controle) e 200 mM. O recipiente foi mantido em câmara de crescimento (25 °C, 12/12 h de fotoperíodo) durante 72 horas (Figura 2). As raízes foram medidas após o cultivo das plântulas e o resultado foi expresso como comprimento total em centímetros.



**Figura 2.** Esquema do cultivo das plantas de milho 3 e 17-DAG.

## 2.2 Preparação e cultivo das plântulas: 17 dias após germinação (17-DAG)

Sementes de milho (cv. IPR 164) foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 5 min e lavadas com água destilada. A germinação ocorreu por 48 horas no escuro, a 25 °C, com as sementes acomodadas entre folhas de papéis (Germitest CEL-060). Duas plântulas foram selecionadas e incubadas em vaso plástico contendo substrato vermiculita:pinus (50/50, m/m), regado com 60 mL de água destilada. Após serem colocadas nos vasos as plântulas foram regadas, em dias alternados, com solução nutritiva (Hoagland, Arnon, 1950), sem NaCl, até o sétimo dia. A partir do sétimo dia foi realizado o tratamento com 60 mL de solução nutritiva nas concentrações de 0 e 200 mM NaCl em dias alternados por 12 dias de tratamento (Figura 2). Os vasos foram mantidos em bancada (25 °C, 12/12 h de fotoperíodo) durante os 17 dias de cultivo. As raízes foram medidas após o cultivo das plântulas e o resultado foi expresso como comprimento total em centímetros.

## 2.3 Determinação da atividade coniferaldeído desidrogenase (CALDH)

Foi pesado 1 g de raízes de milho (biomassa fresca) e macerado com 1,5 mL de tampão de extração (DTT 5 mM, EDTA 1 mM, 10% de glicerol (v/v) em tampão Hepes-HCl 50 mM pH 8,0). A suspensão foi centrifugada a 2.200 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi mantido em gelo e submetido à precipitação com sulfato de amônio 70% (m/v). Realizou-se mais uma centrifugação a 2.200 g por 10 min a 4 °C o sobrenadante foi armazenado em gelo sendo esse considerado o extrato enzimático final. A realização do ensaio enzimático foi feita acompanhado a oxidação de coniferaldeído a ácido ferúlico. O meio de reação era composto de 100 µL de extrato enzimático, 540 µL do tampão de reação DTT 5 mM em tampão Hepes-HCl 50 mM, pH 8,0 e 200 µL de NAD<sup>+</sup> 5 mM. A reação foi incubada a 40 °C e iniciada com a adição de 100 µL de coniferaldeído 1 mM. Após 10 minutos a reação foi encerrada com 60 µL de HCl 3 M. Após centrifugação (16.000 g, 2 min), as amostras foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu<sup>®</sup> Prominence 20, Japão) e separadas em coluna C-18 de fase reversa Supelco<sup>®</sup> (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi metanol:ácido acético 4% (30/70, v/v) com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> para corrida isocrática de 20 min. O ácido ferúlico foi detectado a 322 nm por comparação com o tempo de retenção de seu respectivo padrão. A atividade enzimática foi expressa como nmol de produto min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> biomassa fresca.

#### *2.4 Determinação da atividade cafeato 3-O-metiltransferase (COMT)*

Foi pesado 1 g de raízes de milho (biomassa fresca) e macerado com 1,5 mL de tampão de extração (DTT 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM, 10% de glicerol (v/v) em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,2). A suspensão foi centrifugada a 2.200 g por 15 min, 4 °C, o sobrenadante foi considerado o extrato enzimático final. A realização do ensaio enzimático foi realizada acompanhando a oxidação de ácido cafeico a ácido ferúlico. O meio de reação continha 200 µL de extrato enzimático, tampão de reação Tris-HCl 100 mM, DTT 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM (pH 7,2) e 100 µL de SAM 6 mM. A reação foi incubada a 30 °C e iniciada com a adição de 100 µL de ácido cafeico 1 mM. Após 30 minutos a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de HCl 3 M. Após centrifugação (16.000 g, 2 min), as amostras foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu<sup>®</sup> Prominence 20, Japão) e separadas em coluna C-18 de fase reversa Supelco<sup>®</sup> (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi metanol:ácido acético 4% (30/70, v/v) com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> para corrida isocrática

de 20 min. O ácido ferúlico foi detectado a 322 nm em comparação com seu respectivo padrão. A atividade enzimática foi expressa como nmol de produto  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  biomassa fresca.

### *2.5 Determinação da atividade das isozimas 4-coenzima A ligase (4-CL) e feruloil-coenzima A ligase (FCL)*

Foi pesado 1 g de raízes de milho (biomassa fresca) e macerado com 1,5 mL de tampão de extração contendo tampão Tris-HCl 200 mM (pH 7,5), DTT 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, 20 % de glicerol e 50 mg de PVP. A suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 20 min a 4 °C, sendo o sobrenadante considerado o extrato enzimático final. O volume final do meio de reação (1 mL) continha 200  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, ATP 4 mM, ácido *p*-cumárico 0,4 mM e coenzima A 0,2 mM, em tampão de incubação Tris/HCl 200 mM pH 7,5 contendo DTT 5 mM e  $\text{MgCl}_2$  10 mM. A reação foi iniciada com adição de coenzima A, conduzida em banho-maria a 35°C por 10 min e lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2450). O aumento da absorbância em 333 nm, decorrente da formação de *p*-cumaroil-CoA foi monitorado contra branco desprovido de CoA e ATP. Para avaliação da enzima FCL o substrato da reação foi substituído por ácido ferúlico 0,4 mM e a absorbância foi detectada a 319 nm. A atividade enzimática foi expressa como nmol de produto  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  biomassa fresca.

### *2.6. Preparação da parede celular*

Após estarem secos e triturados 0,3 g de tecido vegetal foram homogeneizados em 7 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e centrifugados a 1.400 g por 6 min conforme Ferrarese et al. (2000). O sobrenadante foi descartado a cada lavagem. Foram efetuadas mais 2 lavagens com 7 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (7 mL); 3 lavagens com 1% (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 em tampão pH 7,0 (7 mL); 2 lavagens com NaCl 1 M em tampão pH 7,0 (7 mL); 2 lavagens com água destilada (7 mL) e 2 lavagens com acetona (5 mL). O material foi seco em estufa (60 °C por 24 h) e a massa definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

### *2.7. Quantificação da lignina por brometo de acetila*

Para a determinação do teor total de lignina pelo método da lignina solúvel em brometo de acetila utilizou-se a parede celular livre de proteínas. Foram pesados 20 mg do material em tubo de vidro com rosca contendo 0,5 mL de brometo de acetila 25% (v/v em ácido acético) e incubado a 70 °C. Após o tempo de 30 minutos as amostras foram transferidas para banho de gelo e a reação foi interrompida com adição de 0,9 mL de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 6 mL de ácido acético gelado. As amostras foram centrifugadas (1.400 g por 5 min) e o sobrenadante diluído foi utilizado para as leituras em espectrofotômetro (280 nm). A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e foi expressa em mg lignina g<sup>-1</sup> de parede celular (Moreira-Vilar et al., 2014).

### *2.8. Quantificação da composição monomérica*

Para a determinação da composição monomérica de lignina foi utilizada a parede celular livre de proteínas e a quantificação foi feita pela oxidação com nitrobenzeno (Dean, 1997). Foram pesados 50 mg de parede celular isenta de proteínas em ampola Pyrex<sup>®</sup> contendo 1 mL de NaOH 2 M e 0,1 mL de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170 °C por 150 min. Após oxidação, a amostra foi resfriada, lavada 2 vezes com clorofórmio e acidificada a pH 3,0 com 0,35 mL de HCl 5 M. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e analisadas por HPLC. A fase móvel utilizada foi metanol/ácido acético 4% (20/80, v/v), com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para corrida isocrática de 20 min. Os compostos *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram quantificados a 290 nm relacionando-os aos padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de monômero.

### *2.9. Obtenção de extrato metanólico*

Biomassa seca (0,05 g) foi homogeneizada com 4 mL de metanol 50% (v/v), incubado a 80 °C por 90 minutos e centrifugada 3.200 g (4°C por 15 min), o sobrenadante foi reservado. Lavou-se o pellet mais 2 vezes com 1 mL de metanol 50% (v/v) sendo o sobrenadante (volume final 6 mL) reservado juntamente com a fração anterior em câmara fria a 5 °C. O pellet foi seco em estufa (60 °C por 24 h) e destinado à análise de ácido ferúlico esterificado.

### 2.10. Determinação da atividade antioxidante – método DPPH

Para calcular a porcentagem da capacidade antioxidante via atividade sequestradora de radicais livres foram utilizados 100 µL do extrato metanólico e adicionados a 1900 µL da solução de DPPH 0,6 mM (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Após 1 h a temperatura ambiente no escuro a absorbância foi lida a 515 nm. Os valores foram expressos em porcentagem de sequestro de radicais livres (Equação 1).

$$\% = \left( \frac{AC - AM - AB}{AC} \right) \times 100$$

**Equação 1.** Cálculo da porcentagem de sequestro de radicais livres. AC, absorbância do controle negativo; AB, absorbância da amostra + metanol; AM, absorbância amostra.

### 2.11. Análise de ácido ferúlico livre

As frações do extrato metanólico foram filtradas em filtro de 0,45 µm e submetidas para análises em HPLC. A fase móvel utilizada foi metanol:ácido acético 4% (30/70, v/v) com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> para corrida isocrática de 20 min. O ácido ferúlico foi detectado a 322 nm em comparação com seu respectivo.

### 2.12. Extração de ácido ferúlico esterificado a parede celular

O pellet obtido na preparação do extrato metanólico foi ressuspendido em 5 mL de NaOH 0,5 M e incubado a 96 °C por 2 h. Em seguida, a amostra foi acidificada em pH 2,0 com HCl 5 M e centrifugada 3.200 g (4 °C por 15 min), o sobrenadante foi coletado e submetido a separação com éter etílico (2×). As frações etéreas foram combinadas e secas. As amostras foram ressuspendidas em metanol/ácido acético 4% (30/70, v/v) e analisadas em HPLC utilizando ácido ferúlico como padrão.

### 2.13. Teor relativo de água (TRA)

O teor relativo de água é uma medida da deficiência de água nos tecidos, nele compara-se o teor de água do tecido recém extraído, que é considerado como peso fresco, com o peso que o tecido passa ter após ser assumir peso constante, já que toda

água que ele possuía foi evaporada, o resultado é expresso em porcentagem (Equação 2).

$$TRA = \left( \frac{PF - PS}{PF} \right) \times 100$$

**Equação 2.** Cálculo do teor relativo de água. PF, peso fresco; PS, peso seco.

#### 2.14. *Quantificação fenólicos totais*

Foram utilizados 2,5 mL do extrato metanólico (Item 2.9) e adicionados a 125 µL de reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos foram adicionados 375 µL de carbonato de sódio 1,9 M, o carbonato deve ser adicionado no escuro. Após uma hora a leitura é feita em espectrofotômetro a 750 nm. Utilizou-se o branco com 2,5 mL de água no lugar do extrato, para zerar o equipamento. Um padrão de ácido gálico 50 µM é utilizado para realizar os cálculos, sendo os resultados expressos em µg g<sup>-1</sup> de peso seco.

#### 2.15. *Análises estatísticas*

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Foi realizado teste *t*-Student com o programa GraphPad *Prism 5.0* (San Diego, Califórnia) para verificar as significâncias das diferenças entre os parâmetros avaliados, valores de  $0.05 \geq P \geq 0.01$  foram representados por “\*”, valores de  $0.01 \geq P \geq 0.001$  foram representados por “\*\*”, e valores de  $0.001 \geq P$  foram representados por “\*\*\*” sendo todos considerados estatisticamente significativos.

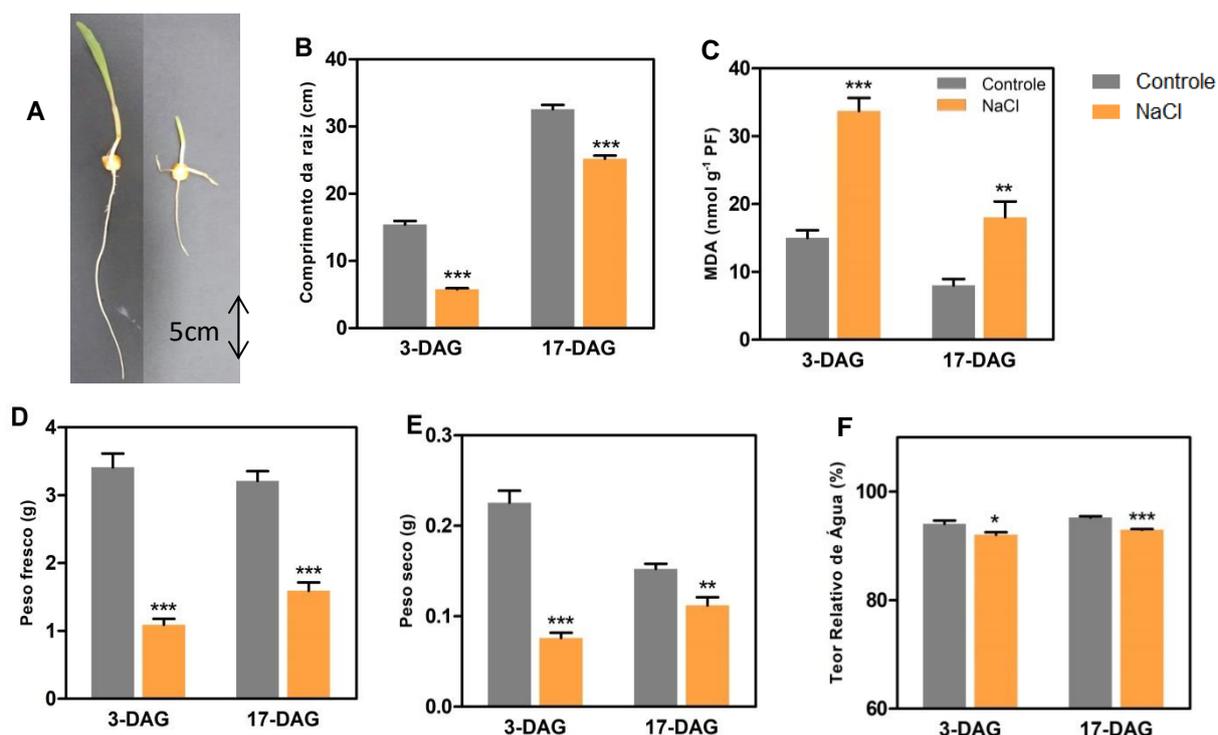
### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. *Avaliação dos parâmetros biométricos e marcador de estresse*

O tratamento com NaCl 200 mM afetou o comprimento das raízes de milho (Figura 3-A e B). Plantas cultivadas por 3-DAG tiveram redução de 62% no

comprimento e uma redução de mais de 22% foi observada nas plantas de 17-DAG (Figura 3-B). Plantas de milho cultivadas por 22 dias em solo salino por Nicasio e colaboradores em 2011, também apresentaram significativa redução no crescimento. Bezerra e Nogueira (1999) avaliaram plantas de milho submetidas a estresse salino de 100 mM por 30 dias e encontraram uma redução do crescimento de 62%. Rodriguez e colaboradores (1997), também verificaram que a taxa de extensão da raiz de milho é reduzida com aumento da concentração de sal (50, 100, ou 150 mM) à qual estava exposta. Estudos de germinação de sementes de milho mostraram que NaCl 200 mM atrasa a germinação e inibe o crescimento das radículas (Meng et al., 2014). O crescimento pode ser inibido devido ao acúmulo de sais que danificam as células das folhas, bem como pela perda na habilidade de captação de água pelas raízes (Munns et al., 2006).

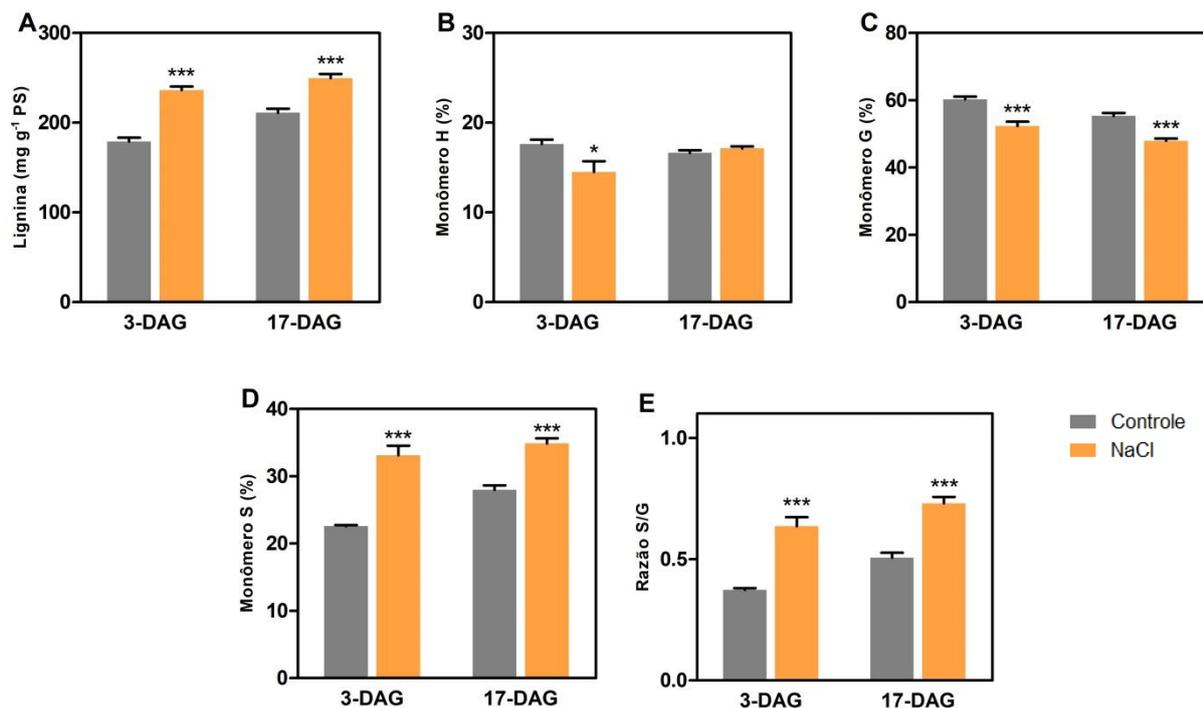
O estresse salino reduz o potencial osmótico e conseqüentemente diminui a capacidade de absorção água da solução nutritiva (Willadino, Camara, 2010). Neste sentido, observamos uma redução de 2% no teor relativo de água em ambos os tempos avaliados (Figura 3-F). Consistente com a diminuição no comprimento das raízes, houve uma redução da biomassa fresca de 68% e 50% (Figura 3-D), e redução da biomassa seca de 65% e 26% (Figura 3-E) nas plantas de 3 e 17-DAG, respectivamente. O cultivo do milho na presença de NaCl 200 mM levou a um aumento de 120% no teor de malondialdeído nas raízes de 3 e 17 DAG, quando comparado com raízes de plantas controle (Figura 3-C). O malondialdeído é um subproduto da peroxidação lipídica e amplamente usado como biomarcador para avaliação de danos oxidativos (Barbosa et al., 2008). No geral, observamos os efeitos deletérios do estresse salino no crescimento das plantas descritos pela literatura.



**Figura 3** – Efeitos do estresse salino nos parâmetros biométricos e na peroxidação lipídica. (A) Foto das raízes de 3-DAG de NaCl 0 (esq.) e 200 mM (dir.). (B) Crescimento da raiz; (C) Malondialdeído; (D) Peso fresco; (E) Peso Seco; (F) Teor relativo de água.. Barras de erro indicam as médias  $\pm$  EPM,  $n = 4-6$ ; Teste t-Student:  $*0.05 \geq P \geq 0.01$ ,  $**0.01 \geq P \geq 0.001$ ,  $***0.001 \geq P$ .

### 3.2 Variações na lignina em resposta ao estresse

O teor de lignina das plantas submetidas ao estresse salino por 3 e 17-DAG aumentou em 31% e 18%, respectivamente, quando comparadas ao controle (Figura 4-A). Para o monômero H encontramos uma redução significativa de 17% apenas para as plantas de 3-DAG (Figura 4-B). O monômero G foi reduzido em 13% em ambos os tempos cultivados sob estresse (Figura 4-C). O monômero S teve um aumento de 46% nas raízes de plantas de 3-DAG e um aumento de 24% nas 17-DAG (Figura 4-D). Assim, é possível concluir que o estresse alterou a composição monomérica das raízes de 3 e 17-DAG das plantas tratadas, elevando a razão S/G em 70% e 44%, respectivamente (Figura 4-E).

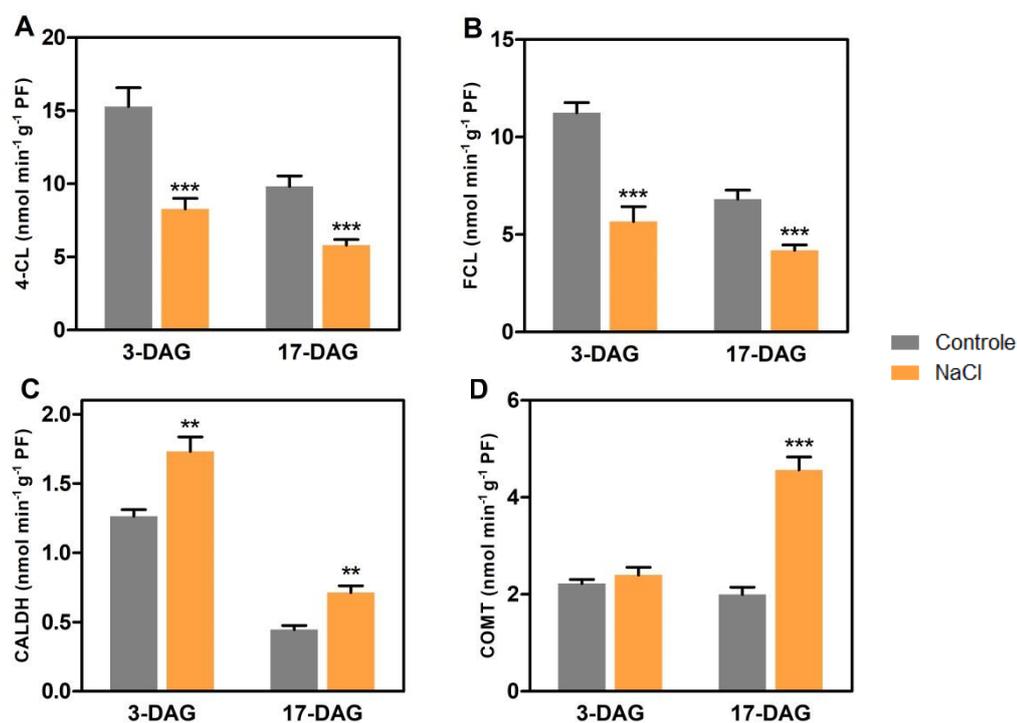


**Figura 4** – Efeitos do estresse salino sobre a lignina total, os monômeros H, G e S e a razão S/G. (A) Lignina total. (B) Monômero H. (C) Monômero G. (D) Monômero S. (E) razão S/G. Barras de erro indicam as médias  $\pm$  EPM,  $n = 5-6$ . Teste t-Student:  $*0.05 \geq P \geq 0.01$ ,  $**0.01 \geq P \geq 0.001$ ,  $***0.001 \geq P$ .

Estudo realizado por Neves e colaboradores (2010) relatou um aumento na atividade de peroxidase, conteúdo de lignina e fenólicos totais, e uma redução do crescimento das raízes após o tratamento de soja com NaCl 200 mM. É possível que este aumento no conteúdo de lignina esteja relacionado com a redução observada no crescimento das plantas. Plantas expostas a aleloquímicos, por exemplo, apresentam aumento do teor de lignina e alteração na sua composição monomérica, tais alterações deixam a parede celular mais rígida restringindo o crescimento da raiz (Salvador et al., 2013). Diferentes regiões da raiz de milho podem responder diferentemente ao estresse, é sabido que a parte basal das raízes de milho submetidas a estresse hídrico apresentam maior redução no crescimento do que a região apical, tal redução foi associada a uma expressão aumentada dos genes da enzima cinamil-CoA redutase, envolvida na biossíntese da lignina (Moura et al., 2010).

### 3.3. Atividades enzimáticas

Nas raízes das plantas de 3-DAG as enzimas 4-CL e FCL apresentaram uma redução de aproximadamente 50% na sua atividade. Já no cultivo por 17-DAG sob estresse salino, a redução foi de 40% para 4-CL e 16% para FCL (Figura 5-A, B). Três genes (4CL2, 4CL11, e 4CL12) ligados à expressão da enzima 4-CL de duas espécies de álamos do deserto tolerantes ao sal, foram alterados significativamente sob estresse salino de 200 mM, sugerindo que a evolução dos genes 4-CL pode ter contribuído para o desenvolvimento da tolerância ao sal nessas plantas (Zhang et al., 2015). Meng (2014) observou que 96 proteínas tiveram seus níveis de expressão alterados quando sementes de milho foram submetidas a estresse salino de 100 ou 200 mM, revelando uma intensa perturbação na expressão gênica em plantas submetidas a estresse salino. Análises de microarranjo de DNA de raízes de arabisopsis tratadas com NaCl revelaram mudanças significativas em 20% dos transcritos do genoma, alguns sendo mais outros menos expressos, com destaque para famílias de genes normalmente subvalorizados como: transportadores, moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e enzimas da via dos fenilpropanoides como 4-CL e COMT (Jiang e Deyholos 2006).



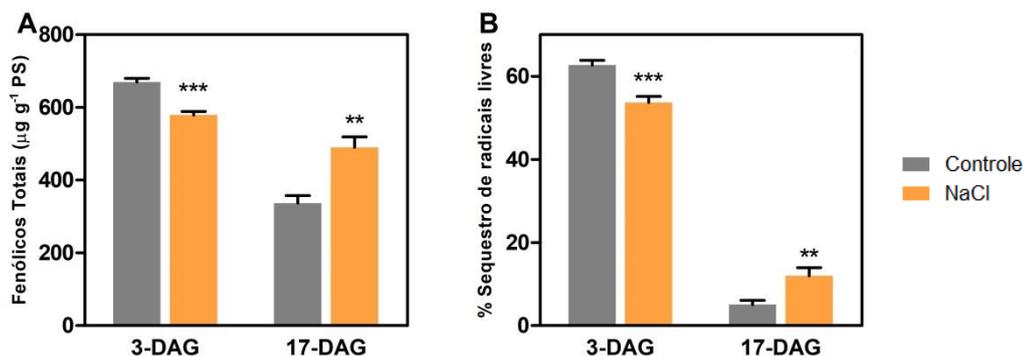
**Figura 5** – Efeitos do estresse salino na atividade enzimática. (A) 4-CL, 4-Coumarate coenzima A ligase; (B) FCL, feruloil coenzima A ligase, (C) CALDH, coniferaldeído desidrogenase, (D) COMT, cafeato 3-*O*-metiltransferase. Barras de erro indicam as médias  $\pm$  EPM.  $n = 5-6$ . Teste t-Student:  $*0.05 \geq P \geq 0.01$ ,  $**0.01 \geq P \geq 0.001$ ,  $***0.001 \geq P$ .

Constatamos um aumento de 35% na atividade da CALDH, nas raízes de plantas de 3-DAG, e um aumento de 60% na atividade da CALDH das plantas de 17-DAG (Figura 5-C). Compostos aldeídicos formam-se em maior quantidade quando o metabolismo é perturbado por estresses abióticos tais como salinidade, seca, calor ou frio extremo (Zhou et al., 2012). As ALDHs são descritas por atuarem em processos de tolerância do vegetal ao estresse abiótico, pois atuam no ajustamento osmótico, desintoxicando a planta do excesso de aldeídos (Perozich et al., 1999). Estudos de Yang e colaboradores (2015) revelaram que plantas de tabaco com expressão ectópica do gene ALDH de *Syntrichia caninervis* apresentam maior tolerância à seca e à salinidade, confirmando a importância das ALDHs em processos de estresse. Por este motivo, Brocker et al. (2013) concluíram que ALDHs representam um alvo importante para o aumento de resistência a condições estressantes.

Nas raízes de plantas de 3-DAG, nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da COMT. Já nas raízes das plantas de 17-DAG, a enzima COMT teve sua atividade aumentada 128% (Figura 5-D). O aumento na atividade da COMT nas raízes de plantas com 17-DAG pode explicar o aumento no monômero S da lignina das plantas com 17-DAG, mas não das plantas com 3-DAG. Nós medimos a atividade da enzima sobre o ácido cafeico o que sugere a existência de isozimas específicas para cada substrato. De fato, os níveis de expressão da COMT apresentaram aumento em estudos com *Tamarix hispida* sob estresse de 400 mM de NaCl por 24 h. Tal regulação positiva relaciona-se com a tolerância ao estresse salino, aumentando a deposição de lignina nos tecidos vasculares das raízes (Li et al., 2009).

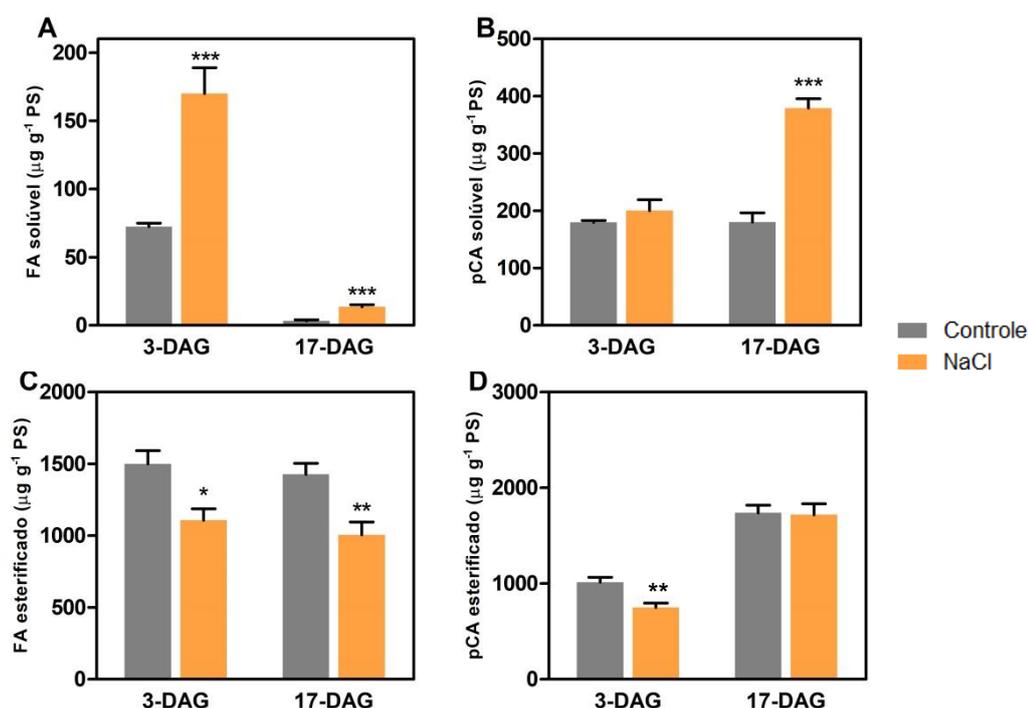
### 3.4 Avaliação dos compostos fenólicos

O teor de fenólicos totais foi reduzido em cerca de 13% nas raízes das plantas de 3-DAG cultivadas sob o estresse salino, em relação às plantas controle. Já nas plantas de 17-DAG observou-se um aumento de 45% (Figura 6-A). Utilizando a técnica de DPPH avaliamos a porcentagem de sequestro de radicais livres e constatamos que as raízes das plantas de 3-DAG tratadas com NaCl 200 mM tiveram a capacidade antioxidante reduzida em 14%, enquanto as plantas de 17-DAG apresentaram um aumento de 136% (Figura 6-B). Tais resultados são consistentes com o perfil encontrado para os compostos fenólicos.



**Figura 6** – Teor de fenólicos totais e avaliação da capacidade antioxidante das plantas submetidas a estresse salino. (A) Fenólicos totais. (B) Porcentagem de sequestro de radicais livres. Barras de erro indicam as médias  $\pm$  EPM.  $n = 5-6$ ; PS, peso seco; Teste t-Student  $*0.05 > P > 0.01$ ,  $**0.01 > P > 0.001$ ,  $***0.001 > P$ .

Um aumento de 134% e 321% no conteúdo de ácido ferúlico solúvel, foi observado nas plantas de 3 e 17-DAG, respectivamente (Figura 7-A). Por sua vez, o ácido *p*-cumárico livre apresentou um aumento de 110% apenas nas plantas de 17-DAG (Figura 7-B). O aumento de ácido ferúlico solúvel nas raízes submetidas ao estresse salino é consequência do aumento da atividade da enzima CALDH (Figura 5-C), pela oxidação de coniferaldeído a ácido ferúlico. Como podemos ver na figura 1 da via dos fenilpropanoides, um aumento na atividade CALDH consome coniferaldeído, que reduz a concentração de substrato para a formação do monômero G, com a consequente redução deste monômero (Figura 4-C).



**Figura 7** – Teor de ácidos hidroxicinâmicos. (A) Ácido ferúlico solúvel. (B) ácido *p*-cumárico solúvel. (C) Ácido ferúlico esterificado à parede celular. (D) Ácido *p*-cumárico esterificado à parede celular (D). Barras de erro indicam médias  $\pm$  EPM.  $n = 5-6$ . Teste t-Student: \* $0.05 > P > 0.01$ , \*\* $0.01 > P > 0.001$ , \*\*\* $0.001 > P$ .

Analisando os teores dos ácidos esterificados à parede celular, observamos uma redução no conteúdo de ácido ferúlico em 25% em ambos os tempos de tratamento, e uma redução de 25% do ácido *p*-cumárico, apenas nas plantas de 3-DAG (Figura 7-C, D).

#### 4. Conclusão

A biossíntese de lignina foi estimulada nas plantas tratadas possivelmente como mecanismo de defesa, houve um aumento da rigidez da parede celular, que associado à dificuldade de expansão celular pela redução do potencial hídrico podem ter contribuído para a redução de crescimento observada. Houve um aumento de 31% e 18% no teor de lignina nas plantas de 3 e 17-DAG respectivamente. Ao investigar a contribuição das enzimas, encontramos uma redução de 50% das atividades das enzimas 4-CL e FCL nas plantas de 3 dias, tal fato não implicou em uma redução da lignina pois possivelmente a atividade está reduzida como mecanismo para reduzir o teor de pCA e FA esterificados à parede celular, enquanto enzimas intermediárias que, provavelmente, estão ativadas permitem o aumento da lignina total. Já a enzima CALDH teve sua atividade aumentada em 37% nas plantas de 3 dias e em 60% nas de 17 dias, embora não haja informação na literatura que demonstre correlação entre atividade CALDH e lignina, ela pode contribuir aumentando intermediários da via e consequentemente aumentando o conteúdo de lignina, é importante ressaltar que ao consumir o coniferaldeído ocorre uma menor produção do monômero G. A enzima COMT teve sua atividade de metiltransferase medida utilizando-se o ácido cafeico como substrato e seu aumento pode ser relacionado positivamente com aumento do monômero S.

O efeito da salinidade sobre as plantas acarreta uma redução do potencial osmótico, diminuindo a capacidade de absorver água da solução nutritiva, há também o acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  que causam desestabilização das membranas celulares e desnaturação de proteínas. Assim, compreender como as plantas percebem sinais de estresse e se adaptam a ambientes adversos é uma questão biológica fundamental.

Melhorar a resistência ao estresse das plantas é crítico para produtividade e para a sustentabilidade ambiental, visto que culturas com baixa resistência ao estresse consomem mais água e fertilizantes, sobrecarregando o meio ambiente. Diferentes modelos de estresse podem ser testados para revelar alterações importantes em vias metabólicas como a da síntese de lignina. Investigar o papel de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina pode ajudar a elucidar seu papel no desenvolvimento da resposta metabólica ao estresse salino bem como auxiliar na seleção e modificação de plantas visando a produção de cultivares resistentes, aumentando a produtividade dos cultivares mesmo na presença de altas concentrações de NaCl. O aumento da salinização da terra arável pode comprometer o cultivo de plantas em um futuro próximo. Por isso, estudos relacionados ao entendimento do metabolismo de plantas submetidas a estresse salino deve ser considerado nos programas de melhoramento e biotecnologia. A compreensão das funções de diferentes enzimas da via dos fenilpropanoides pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias moleculares que permitam a obtenção de cultivares agrícolas mais tolerantes às condições de estresse salino.

## 5. Referências

- Anterola, A. M., Lewis, N. G., 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry*, 61(3), 221-294.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., Paula, S. O. D., Minin, V. P. R., Bressan, J., 2008. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr*, 33(2), 111-128.
- Bezerra Neto, E., Nogueira, R. J. M. C., 1999. Estudo comparativo do crescimento de plantas de tomate e milho sob condições de salinidade. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(4), 0-0.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54(1), 519-546.
- Brocker, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Wang, X., Nebert, D. W., 2013. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*, 237(1), 189-210.
- Buckeridge, M. S., Santos, W. D., Souza, A. D., 2010. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. *Bioetanol da cana-deaçúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*, 365-380.
- Cabot, C., Sibole, J. V., Barceló, J., Poschenrieder, C., 2014. Lessons from crop plants struggling with salinity. *Plant Science*, 226, 2-13.
- Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., McCann, M. C., 2001. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology*, 127(2), 551-565.
- Chen, F., Dixon, R. A., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature biotechnology*, 25(7), 759.
- Fedoroff, N. V., Battisti, D. S., Beachy, R. N., Cooper, P. J., Fischhoff, D. A., Hodges, C. N., Reynolds, M. P., 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century. *science*, 327(5967), 833-834.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., Bromham, L., 2010. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37(7), 604-612.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
- Jiang, Y., Deyholos, M. K., 2006. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biology*, 6(1), 25.

- Končítíková, R., Vigouroux, A., Kopečná, M., Andree, T., Bartoš, J., Šebela, M., ... & Kopečný, D. 2015. Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7. *Biochemical Journal*, 468(1), 109-123.
- Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(5), 377-391.
- Li, H., Wang, Y., Jiang, J., Liu, G., Gao, C., Yang, C., 2009. Identification of genes responsive to salt stress on *Tamarix hispida* roots. *Gene*, 433(1), 65-71.
- Meng, L. B., Chen, Y. B., Lu, T. C., Wang, Y. F., Qian, C. R., Yu, Y., Wang, B. C., 2014. A systematic proteomic analysis of NaCl-stressed germinating maize seeds. *Molecular biology reports*, 41(5), 3431-3443.
- Mottiar, Y., Vanholme, R., Boerjan, W., Ralph, J., Mansfield, S. D., 2016. Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification. *Current opinion in biotechnology*, 37, 190-200.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., De Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., Mazzafera, P., 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of integrative plant biology*, 52(4), 360-376.
- Munns, R., James, R. A., Läuchli, A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*, 57(5), 1025-1043.
- Neves, G. Y. S., Marchiosi, R., Ferrarese, M. L. L., Siqueira-Soares, R. C., Ferrarese-Filho, O., 2010. Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Journal of Agronomy and crop science*, 196(6), 467-473.
- Nicasio-Arzeta, S., Sánchez-Coronado, M. E., Orozco-Segovia, A., & Gamboa-de Buen, A. (2011). Effect of priming and saline substrate on germination and seedling growth of Chalqueño maize (*Zea mays*). *Agrociencia (Montecillo)*, 45(2), 195-205.
- Oliveira, D. M., Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V. H., Moreira-Vilar, F. C., Correa Molinari, H. B., Dantas dos Santos, W., 2015. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant biotechnology journal*, 13(9), 1224-1232.
- Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B. C., Lindahl, R., Hempel, J., 1999. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science*, 8(1), 137-146.
- Rodriguez, H. G., Roberts, J. K., Jordan, W. R., Drew, M. C., 1997. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant physiology*, 113(3), 881-893.
- Sallata, F. V. 2017. Efeitos na feruloilação e metabolismo de fenilpropanoides induzidos por estresse salino em milho. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual de Maringá.

- Sánchez-Aguayo, I., Rodríguez-Galán, J. M., García, R., Torreblanca, J., Pardo, J. M. 2004. Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta*, 220(2), 278-285.
- Sarhadi, E., Bazargani, M. M., Sajise, A. G., Abdolahi, S., Vispo, N. A., Arceta, M., Salekdeh, G. H. 2012. Proteomic analysis of rice anthers under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 280-287.
- Sun, C. X., Li, M. Q., Gao, X. X., Liu, L. N., Wu, X. F., Zhou, J. H., 2016. Metabolic response of maize plants to multi-factorial abiotic stresses. *Plant Biology*, 18(S1), 120-129.
- Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L., Roby, D., 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 83-92.
- Uddin, M. N., Hanstein, S., Faust, F., Eitenmüller, P. T., Pitann, B., Schubert, S., 2014. Diferulic acids in the cell wall may contribute to the suppression of shoot growth in the first phase of salt stress in maize. *Phytochemistry*, 102, 126-136.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant physiology*, 153(3), 895-905.
- Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2000. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations. In IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560(pp. 285-292).
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Willadino, L., Camara, T. R., 2010. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. *Enciclopédia biosfera*, 6(11), 1-23.
- Yang, H., Zhang, D., Li, H., Dong, L., Lan, H., 2015. Ectopic overexpression of the aldehyde dehydrogenase ALDH21 from *Syntrichia caninervis* in tobacco confers salt and drought stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95, 83-91.
- Zhang, C. H., Ma, T., Luo, W. C., Xu, J. M., Liu, J. Q., Wan, D. S., 2015. Identification of 4CL genes in desert poplars and their changes in expression in response to salt stress. *Genes*, 6(3), 901-917.
- Zhou, M. L., Zhang, Q., Zhou, M., Qi, L. P., Yang, X. B., Zhang, K. X., Wu, Y. M., 2012. Aldehyde dehydrogenase protein superfamily in maize. *Functional & integrative genomics*, 12(4), 683-691.
- Zhu, J. K., 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.