

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO
VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**REFLEXOS DA AUSÊNCIA DE CLOROFILA NA COMPOSIÇÃO DE PAREDE CELULAR
E NA FISIOLOGIA DE PLÂNTULAS ALBINAS DE FLAMBOYANT [*Delonix regia* (Bojer
ex Hook) Raf.]**

Autor: Thyago Naves da Costa

Orientador: Dr. Diego Ismael Rocha

Coorientadores: Dra. Valdnea Casagrande Dalvi

Dr. Vinicius Coelho Kuster

RIO VERDE – GO

05/2022

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS

RIO VERDE

DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**REFLEXOS DA AUSÊNCIA DE CLOROFILA NA COMPOSIÇÃO DE PAREDE
CELULAR E NA FISIOLOGIA DE PLÂNTULAS ALBINAS DE FLAMBOYANT [*Delonix
regia* (Bojer ex Hook) Raf.]**

Autor: Thyago Naves da Costa

Orientador: Dr. Diego Ismael Rocha

Coorientadores: Dra. Valdnea Casagrande Dalvi

Dr. Vinicius Coelho Kuster

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Área de concentração em Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO

05/2022

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

dd118\ da Costa, Thyago Naves
\"REFLEXOS DA AUSÊNCIA DE CLOROFILA NA COMPOSIÇÃO
DE PAREDE CELULAR E NA FISILOGIA DE PLÂNTULAS
ALBINAS DE FLAMBOYANT [Delonix regia (Bojer ex Hook)
Raf.]\" / Thyago Naves da Costa; orientador Diego
Ismael Rocha; co-orientadora Valdnea Casagrande
Dalvi. -- Rio Verde, 2022.
42 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós Graduação
em Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal
Goiano, Campus Rio Verde, 2022.

1. Albinismo. 2. Clorofila. 3. Imunocitoquímica.
4. Metabolismo do Carbono. 5. Parede Celular. I.
Rocha, Diego Ismael , orient. II. Dalvi, Valdnea
Casagrande , co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:
Thyago Naves da Costa

Matrícula:
2020102310840136

Título do trabalho:
REFLEXOS DA AUSÊNCIA DE CLOROFILA NA COMPOSIÇÃO DE
PAREDE CELULAR E NA FISIOLOGIA DE PLÂNTULAS ALBINAS DE

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01 /08 /2022

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde

18 /07 /2022

Local

Data

Thyago Naves

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Diego Kocha

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 1/2022 - GTI-RV/DAP-RV/CMPRV/IFGOIANO

REFLEXOS DO ALBINSMO NA COMPOSIÇÃO DE PAREDE CELULAR E NA FISILOGIA DE PLÂNTULAS
DE *Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.

Autor: Thyago Naves da Costa
Orientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos
Recursos Naturais

APROVADA em 30 de maio de 2022.

Prof.^a Dr.^a Juliana de Fátima Sales
Avaliadora Externa
IF Goiano/RV

Dr. Denis Coelho de Oliveira
Avaliador externo
UFU/Uberlândia

Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Presidente da Banca/UFV

Documento assinado eletronicamente por:

- Juliana de Fatima Sales, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 30/05/2022 20:23:30.
- Denis Coelho de Oliveira, Denis Coelho de Oliveira - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano (1), em 30/05/2022 17:21:24.
- Diego Ismael Rocha, Diego Ismael Rocha - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (10651417000500), em 30/05/2022 17:12:56.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 19/05/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 390985
Código de Autenticação: 727b4b8bb0



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

Primeiramente a Deus, por ser essencial e único na minha vida;

"O sábio não se eleva pela prosperidade nem se abate pela adversidade; pois sempre ele se esforçou para confiar predominantemente em si mesmo e obter toda a alegria." -

Sêneca

"Você tem poder sobre sua mente, não sobre eventos externos. Perceba isso e você encontrará força." - Marcus Aurelius

A minha avó Joana Beraldo;

À minha mãe Aparecida Maria Naves da Costa;

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me manteve firme durante toda a minha vida.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela oportunidade de estudar nesta incrível instituição.

À CAPES e FAPEG, pelo apoio financeiro, por meio do Edital nº 018/2020 PDPG CAPES/FAPEG.

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Diego Ismael Rocha, pela dedicação, orientação, paciência e compromisso na conquista do conhecimento adquirido durante essa jornada.

Ao coorientadores, Dra. Valdneá Casagrande Dalvi e ao professor Dr. Vinícius Coelho Kuster, pelas contribuições enriquecedoras no meu trabalho.

Aos meus amigos, pois sem eles nada seria possível me apoiaram durante todo o percurso, desde a seleção do Mestrado e a cada conquista. Em especial, agradeço as amigas Ana Claudia de Oliveira e a Renata Chavaglia, que estiveram sempre dando força para dar continuidade aos estudos. Obrigado por tudo.

A minha amada parceira de vida e de aventuras na natureza Silma de Oliveira Gondim, agradeço o apoio e logo me desculpo pelos momentos em que me ausentei para estudar, sempre pensando no melhor futuro para nós.

À minha mãe, Aparecida Maria Naves da Costa, que mesmo sem entender muito meus objetivos apoia sempre minhas decisões, algumas de perto, outras de longe, mas sempre importantes nesta trajetória.

A todos os docentes pela oportunidade e qualidade de estudos que tive no decorrer do mestrado PPGBio.

Ao Laboratório de Sementes, coordenado pela professora Dra. Juliana Salles, pelo suporte, abertura a pesquisa e parceria na execução desta pesquisa.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, coordenado pela professora Dra. Valdneá Casagrande Dalvi, pelo suporte e parceria na execução desta pesquisa.

Agradeço também às minhas caras colegas Ingrid Maressa Hungria e Leidiane Santos, pela parceria e objetividade nos estudos de fisiologia vegetal, isso foi desafiador e inesquecível, mas sobrevivemos.

Ao Doutor Arthur Almeida Rodrigues, em especial por estar sempre à disposição para conversar sobre carreira e dar dicas sobre as técnicas de laboratório e estudos.

Ao meu amigo Anderson Dias, que juntos sabemos como é uma etapa de análises bioquímicas, foi engrandecedor na minha pesquisa. Também agradeço aos demais colegas de sala e amigos (a) que fiz entre os integrantes de todos os PPGs.

Aos membros da banca, a professora Dra. Juliana Salles e o professor Dr. Denis Coelho, que aceitaram meu convite para avaliação da pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA DO AUTOR

THYAGO NAVES DA COSTA, filho de Maria Aparecida Naves da Costa, nascido em 17 de agosto de 1982, na cidade de Goiânia no estado de Goiás. Em agosto de 2003, ingressou no curso de Bacharelado em Administração de Empresas pela Faculdade Padrão, Sociedade de Educação e Cultura de Goiás Ltda, graduando-se no ano de 2007. Em agosto de 2014, iniciou a Especialização em Inovação em Mídias Interativas pelo MediaLab/UFG e concluiu em fevereiro de 2016, sob a orientação do Professor Dr. Cleomar de Sousa Rocha. Em março de 2020, iniciou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação Biodiversidade e Conservação no Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde, sob a orientação do Professor Dr. Diego Ismael Rocha no qual desenvolveu a Dissertação intitulada Reflexos da Ausência de Clorofila na Composição de Parede Celular e na Fisiologia de Plântulas Albinas de Flamboyant [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.].

RESUMO

A perda parcial ou completa de pigmentos de clorofila caracteriza um fenômeno raro em plantas, o albinismo vegetal. Plântulas albinas de [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]. foram reportadas recentemente e estudo prévio evidenciou alterações na micromorfologia estomática e nas dimensões dos tecidos foliares, em relação aos homólogos selvagens. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar os possíveis reflexos da perda de clorofila na fisiologia, metabolismo e na estrutura da parede celular de folhas e epicótilos de plântulas albinas de *D. regia*, como observado em trabalhos recentes publicados com estudos de *Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). Sementes de *D. regia* foram germinadas e a frequência de plântulas do tipo selvagem (WT) e albinas foram determinadas. O conteúdo de clorofila, bem como, de metabólitos associados ao metabolismo de carbono e de nitrogênio foram quantificados. Amostras de folíolos e do epicótilo de ambos os fenótipos foram processadas seguindo procedimentos comuns para análise com microscopia de luz e de imunofluorescência. As plântulas albinas representaram 16% das sementes presentes nas vagens. Contudo, apenas 15% das vagens deram origem a plântulas albinas. Essas plântulas apresentaram conteúdo de clorofila e carboidratos com menores concentrações em glicose, frutose, sacarose e amido. Em contrapartida, o conteúdo de proteínas e aminoácidos foi, respectivamente, 31,8% e 65,3% maior em comparação aos homólogos selvagens. As plântulas albinas apresentaram folíolos e epicótilos com menor diferenciação histológica. Análises de trocas gasosas também mostraram que o albinismo altera a eficiência do aparelho fotossintético, uma vez que, a taxa de assimilação de carbono, transpiração, eficiência do uso da água e condutância estomática foram menores em plântulas albinas. Os resultados também indicaram a ocorrência de estresse oxidativo e lipídico nas mesmas, embora o conteúdo da maioria de macro e micronutrientes tenha sido maior em plântulas albinas. Observa-se, ainda, menor deposição de pectinas e xiloglucano nas paredes celulares de órgãos albinos. Estes resultados evidenciam o amplo reflexo da perda de clorofila no metabolismo e na fisiologia de *D. regia* e o papel essencial dos pigmentos fotossintéticos no desenvolvimento dos tecidos vegetais, desta forma, diferenças entre as plântulas selvagens e albinas podem ser ressaltadas, em diversos aspectos de estudos relacionados ao assunto.

Palavras-chave: Albinismo; Clorofila; Imunocitoquímica; Metabolismo do Carbono; Parede Celular.

ABSTRACT

The partial or complete loss of chlorophyll pigments characterizes a rare phenomenon in plants, the plant albinism. Albino seedlings of [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]. were recently reported and a previous study showed changes in stomatal micromorphology and in the leaf tissues dimensions, in relation to wild-type homologs. Thus, the present study aimed to determine the possible effects of chlorophyll loss on the physiology, metabolism and cell wall structure of leaves and epicotyls of albino seedlings of *D. regia*, as observed in recent works published with studies of *Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). *D. regia* seeds were germinated and the frequency of wild type (WT) and albino seedlings was determined. Chlorophyll content, as well as metabolites associated with carbon and nitrogen metabolism were quantified. Leaflet and epicotyl samples of both phenotypes were processed following common procedures for analysis with light and immunofluorescence microscopy. The albino seedlings represented 16% of the seeds present in the pods. However, only 15% of the pods rise to albino seedlings. These seedlings had chlorophyll and carbohydrate content with lower concentrations of glucose, fructose, sucrose and starch. In contrast, the protein and amino acid content was, respectively, 31.8% and 65.3% higher compared to wild-type counterparts. The albino seedlings presented leaflets and epicotyls with less histological differentiation. Gas exchange analyzes also showed that albinism alters the photosynthetic apparatus efficiency, since the rate of carbon assimilation, transpiration, water use efficiency and stomatal conductance were lower in albino seedlings. The results also indicated the occurrence of oxidative and lipid stress in them, although the content of most macro and micronutrients was higher in albino seedlings. It is observed lower deposition of pectins and xyloglucan in the cell walls of albino organs. These results show the broad reflection of the chlorophyll loss in the metabolism and physiology of *D. regia* and the essential role of photosynthetic pigments in the development of plant tissues, thus, differences between wild and albino seedlings can be highlighted in several aspects of studies related to the subject.

Keywords: Albinism; Chlorophyll; Immunocytochemistry; Carbon Metabolism; Cell Wall.

INTRODUÇÃO

A perda parcial ou completa de clorofila caracteriza um fenômeno raro em plantas, o albinismo vegetal [5]. As plantas albinas são caracterizadas pela cor branca / pálida de órgãos vegetais normalmente verdes [6]. Esse fenômeno já foi reportado em mais 54 espécies florestais, sendo 42 espécies arbóreas [7]. A ocorrência do albinismo vegetal pode ser por um ou uma combinação de fatores, incluindo genótipo, ambiente, balanço hormonal e mutações genéticas [8]. Luz e temperatura, por exemplo, desempenham papel na determinação da frequência de formação de plantas albinas. Em geral, baixas temperaturas e baixa incidência de luz podem induzir aumento na frequência de plantas albinas na população [8, 9]. O albinismo também é frequentemente reportado em programas de melhoramento como resultado de cruzamentos interespecíficos ou a partir da manipulação de poliploides, embora, também seja encontrado na natureza. As clorofilas são essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento das plantas após o processo de germinação. Esses pigmentos são necessários para a captação de energia luminosa, possibilitando a produção de compostos orgânicos essenciais para o desenvolvimento e reprodução das plantas [1].

As clorofilas possuem papel determinante na relação entre absorção, transferência e conversão da energia luminosa em energia química em organismos fotossintéticos [2]. que desempenham papéis importantes na diferenciação dessa organela e na síntese e regulação do sistema fotossintético [2]. A biogênese do cloroplasto está coordenada com o crescimento da folha para permitir uma mudança do metabolismo heterotrófico para o fotoautotrófico. A folha se torna fotossinteticamente ativa ao mesmo tempo que muda sua morfogênese [3].

As clorofilas estão essencialmente localizadas nas membranas dos tilacoides dos cloroplastos. Essa organela está relacionada com o desenvolvimento foliar e eficiência do aparelho fotossintético [2]. A sinalização do cloroplasto é, também, determinante para vários mecanismos de desenvolvimento da planta, incluindo a diferenciação de células e tecidos [4]. A fenotipagem de plantas com defeitos na expressão de genes do cloroplasto revelaram a importância dos plastídios para o desenvolvimento e arquitetura da folha [1].

Os fatores genéticos são ainda mais determinantes no albinismo. Estudos evidenciaram que o albinismo é uma característica recessiva governada por muitos loci, podendo ser resultante de mutações em genes responsáveis pela biogênese da clorofila ou do próprio aparato fotossintético [10], plantas persistentemente aclorofiladas, para as quais a ausência de cloroplastos é o resultado de alguma instabilidade genética ou de desenvolvimento se tornam

ainda mais raras, são fonte de estudos sobre o albinismo [11]. Assim, mutantes albinos representam excelente material para estudar a fotossíntese e a influência dos pigmentos fotossintéticos no metabolismo e no desenvolvimento vegetal [12].

O albinismo pode ser letal para as plantas, uma vez que, não conseguem crescer autotróficamente. Em plântulas, o albinismo ocasiona morte prematura do organismos, logo após as suas reservas terem sido consumidas [6]. Como a maioria dos pigmentos fotossintéticos das folhas encontra-se distribuídos em plastídios, está claro que o albinismo envolve alterações dramáticas na biogênese do cloroplasto. A maior parte das pesquisas nesta área reportou alterações na ultraestrutura dos plastídios de plantas albinas em comparação com as plantas verdes [10]. O albinismo afeta, também, a fotossíntese e o metabolismo energético, culminando no menor crescimento e desenvolvimento das plantas [12]. Os parâmetros fotossintéticos mais baixos dos mutantes albinos são provavelmente causados por alterações na estrutura do cloroplasto ou pela diminuição no conteúdo de clorofila [2].

A diferenciação do cloroplasto é importante regulador do início de expansão celular e da fotossíntese em folhas [13]. A sinalização do cloroplasto é, também, determinante para vários mecanismos de desenvolvimento da planta, incluindo a diferenciação de células e tecidos [4]. Mudanças na atividade e formação do cloroplasto, portanto, podem afetar o tamanho e a forma das folhas, sendo esses, fatores essenciais que determinam o desempenho da planta e sua atividade fotossintética. A morfologia da folha influencia os principais parâmetros fotossintéticos, como a eficiência de absorção de luz e troca gasosa [1]. Alterações ocorridas nas folhas demonstram, também, que o cloroplasto está intimamente ligado a organização celular e o arranjo do mesófilo foliar [6].

A ausência de cloroplastos nos órgãos vegetais bloqueia a função estomática, já que sinais luminosos não são interpretados pelo aparelho fotossintético. Órgãos vegetais albinos, geralmente apresentam maior densidade e condutância estomática [6, 11]. A incapacidade de as folhas albinas realizarem fotossíntese diminui drasticamente a função do ciclo de Calvin e sua formação de produtos e subprodutos importantes para o acúmulo de massa seca. O ganho reduzido de carbono resulta, ainda, em menor área foliar, menor diferenciação dos tecidos vegetais e, portanto, menores relações folha / xilema. Além disso, o xilema de órgãos vegetativos albinos se torna estruturalmente mais fraco e mais suscetível à embolia induzida pela seca [11].

As paredes celulares são os principais componentes das células vegetais e apresentam impacto significativo no desenvolvimento celular, crescimento e nas propriedades mecânicas dos órgãos vegetais [14]. As paredes das células vegetais são constituídas por componentes

altamente complexos de polissacarídeos estruturalmente diversos que contribuem para uma variedade de processos celulares. A deposição de diferentes polímeros dentro das paredes celulares é um processo altamente orquestrado [15]. Logo, a ineficiência deste processo de deposição de polímeros pode acarretar processos de estresse, falhas no transporte hídrico e absorção de nutrientes [16-18].

Os polissacarídeos hemicelulósicos são moléculas complexas que se associam às microfibrilas de celulose, fornecendo uma matriz reticulada [19]. A biossíntese de polissacarídeos da parede celular de plantas parece permitir a diversidade evolutiva e ambiental, em que as microfibrilas de celulose tornam-se laminadas para aumentar a resistência da parede e ficam incrustadas com lignina, que é uma grande molécula polifenólica que torna a parede resistente às forças compressivas [20].

As pectinas, juntamente com as proteínas, influenciam em funções como porosidade, adesão, rigidez e flexibilidade, além de regular o crescimento celular da parede [21]. As pectinas contribuem para a resistência mecânica e rigidez da parede celular e estão envolvidas em muitos processos, incluindo deslizamento da parede, extensão e sinalização intercelular [20], e sua desmetil esterificação resulta em desequilíbrio de rigidez e porosidade [21].

A lignina, por sua vez, é o composto mais abundante nas árvores, depois da celulose [17]. A lignificação dos tecidos vegetais ocorre através da atividade felilalanina-amônia-liase (PAL), e os monolignóis sintetizados por essas ações são polimerizados para formar macromoléculas de lignina juntamente com a participação de peroxidases (POX) [22]. Mutantes albinos demonstraram alterações na lignificação, processo que tem papel crucial na formação da parede celular de determinados tipos celulares e no transporte de água [17].

Recentemente, plântulas albinas de *Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf., espécie lenhosa semidecídua popularmente conhecida como royal ponciana ou flamboyant, foram encontradas no município de Rio Verde, GO, Brasil [6]. Alterações na micromorfologia foliar foram observadas nas mudas albinas dessa espécie. Além disso, as células da epiderme das folhas dos indivíduos albinos de *D. regia* eram menores e menos sinuosas. Essas alterações estruturais evidenciaram possíveis efeitos da ausência de clorofila, na deposição de parede celular. Considerando o papel crucial dos pigmentos fotossintéticos no metabolismo vegetal, o presente estudo teve como propósito determinar possíveis relações entre a síntese de clorofila, a deposição de parede celular e o metabolismo primário e secundário nas plântulas selvagens e plântulas albinas a fim de conhecer e compreender os reflexos do albinismo na morfofisiologia vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Vagens de *Delonix regia* foram coletadas de uma matriz localizada no município de Rio Verde (17°48'11.8"S 50°54'21.8"O) no estado de Goiás, Brasil. Esse indivíduo foi escolhido pela ocorrência de albinismo em plantas oriundas de suas sementes [6]. Ao total, foram coletadas 350 vagens. As sementes de cada vagem foram retiradas, armazenadas em sacos de papel e mantidas em geladeira a 4°C.

Germinação

No momento da sementeira, 250 sementes, devidamente identificadas com numeração de vagens e quantidade de sementes por vagem, foram escarificadas mecanicamente com lixa de óxido de alumínio – gramatura 120 - A257 Norton® (Guarulhos, SP, Brasil) e semeadas em tubos de polipropileno (400 cm³) contendo o substrato comercial Bioplant® (Nova Ponte, MG, Brasil), areia lavada com mistura de 1/1 e irrigação controlada 3 vezes ao longo do dia com intervalos de 8 horas. As sementes foram mantidas nessa condição por 30 dias. Esse procedimento foi repetido quatro vezes. Em cada sementeira foi determinado o número de sementes por vagem e a porcentagem de germinação e de plântulas selvagens e albinas. Todos os parâmetros foram determinados 15 dias após a sementeira. Registros fotográficos foram realizados usando câmera Sony Alfa α NEX F3.

Determinação do teor de clorofila e proteína solúvel

Amostras de folhas de plântulas selvagens e albinas de *D. regia* foram coletadas após 15 dias de sementeira. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20°C até a realização das análises. Para a quantificação da clorofila, as amostras de folhas foram submetidas à extração com etanol. As absorbâncias dos extratos foram determinadas usando um espectrofotômetro UV-Visível a 665 e 645 nm. O conteúdo desses pigmentos foi calculado de acordo com as equações (1) e (2) apresentadas a seguir. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco.

$$\text{Clorofila a } \frac{1}{4} 5:21 \times \text{Ab665} - 2:07 \times \text{Ab645} \quad (1)$$

$$\text{Clorofila b } \frac{1}{4} 9:29 \times \text{Ab645} - 2:74 \times \text{Ab665} \quad (2)$$

Para quantificação de clorofila total, as quantidades de clorofila a e b foram somadas. Para obter o teor de proteína solúvel total, o precipitado (fração insolúvel) resultante do pigmento etanol, a extração foi ressuspensa em 0,2 M KOH. A quantificação foi realizada seguindo a

metodologia de Bradford [23]. As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA) a 595 nm.

Determinação dos parâmetros de trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância total estomática (gtw), a transpiração (E), a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) e a eficiência instantânea do uso da água (A/E) foram determinadas nas folhas de plantas selvagens (WT) e albinas, com repetição de 8 plântulas, divididas em 4 selvagem e 4 albinas de forma planejada e variada de cada plântula.

As avaliações foram realizadas entre as 08h e 11h, em sistema aberto, sob irradiância de saturação variável de 0, 50, 100, 150, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 25°C e concentração de CO₂ constante 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, como descrito em Iio et al. (2005), utilizando analisador de gases infravermelho e medidor de trocas gasosas (CO₂ e vapor d'água) denominado IRGA (Infrared Gas Analyzer – LI-6400), obtendo assim, a taxa de fotossíntese líquida (FSL, $\mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) representativa da planta. Estas curvas também foram realizadas em cada um dos tempos de avaliação. Os dados de fotossíntese líquida atual foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. Além disto, equações de regressão também foram utilizadas para a interpretação dos resultados. Média das áreas foliares das folhas utilizadas obtidas pelo software ImageJ como processo de transformação de imagem em Bitmap e cálculo da área em diferencial de cor.

Perfil Metabólico

A determinação de metabólitos primários foi feita por extração metanólica a quente como estabelecido anteriormente [24]. As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram determinadas conforme [25]; aminoácidos livres. Além disso, na fração insolúvel da extração metanólica foi feita a quantificação de amido [25].

Perfil Mineral

Para a determinação do perfil mineral, amostras (1,2 g) de folhas de plantas selvagens e (1,2 g) de folhas de plantas albinas (n = 3) foram lavadas em água deionizada e seco em estufa com circulação forçada de ar a 70°C, até peso constante. Em seguida, foi pesado (0,5 g) para a obtenção da matéria seca, moído em moinho tipo Wiley, equipado com peneira de 20 mesh. O N-total foi determinado pelo método [26], descrito por [27] e o N-NO₃⁻, de acordo com [28].

Os demais elementos foram analisados após mineralização pela digestão nitroperclórica. O B foi determinado colorimetricamente pelo método da Azometina H [29], após a mineralização por via seca em mufla a 550°C. O P foi dosado colorimetricamente pelo método de redução do fosfomolibdato pela vitamina C, de acordo com [30]; o K, por fotometria de emissão de chama; o Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu, por espectrofotometria de absorção atômica; e o S determinado por turbidimetria do sulfato [31].

Determinação do teor de lignina e enzimas antioxidantes

Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo: amostras de 0,250 mg de cada repetição por tratamento foram armazenadas em papel alumínio e mantidas em nitrogênio (N₂) líquido durante todo procedimento de coleta e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80°C para posteriores análises. A obtenção do extrato para determinar a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases inespecíficas (POX), e felilalanina-amônia-liase (FAL) e polifenoloxidase (PPO): foram proveniente de 0,2 g de fragmentos de tecido foliar macerados com N₂ líquido em almofariz e homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), contendo 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e 3% de polivinilpirrolidona (PVPP) (m/v). O homogeneizado foi mantido em banho de gelo por 3 hora e depois centrifugado a 12000 × g, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi usado como extrato para a realização das reações enzimáticas.

A atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Del Longo et al., (1993), com algumas modificações. A uma mistura de reação, constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM, foi adicionado 100 µL do extrato foliar, totalizando 1 mL. A reação foi realizada a 25°C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após exposição à luz por 15 min, a iluminação foi interrompida e a formação azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA) a 560 nm, conforme descrito por [32]. As amostras controle mantidas no escuro por 15 min, contendo a mesma mistura descrita acima, tiveram suas absorbâncias medidas a 560 nm. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT [33].

A atividade da CAT foi determinada pelo método de [34], com algumas modificações. A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A uma mistura de reação, constituída de tampão fosfato de

potássio 50 mM (pH 6,8) e de H₂O₂ 20 mM, foi adicionado 100 µL do extrato de tecido foliar, totalizando 2 mL. A atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm, durante 3 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ [35], foi usado para determinar a atividade das CAT, a qual foi expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de [36], com algumas modificações. A uma mistura de reação, constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H₂O₂ 1 mM e ascorbato 0,8 mM, foi adicionado 50 µL do extrato de tecido foliar, em um volume final de 2 mL. A reação foi medida pela oxidação do H₂O₂ dependente do ascorbato a 290 nm, durante 5 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ [36], foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia proposta por [37], com algumas modificações. A uma mistura de reação, constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM, foi adicionado 25 µL do extrato de tecido foliar, em um volume final de 2 mL. A reação foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nm, durante 3 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em µmol de purpurogalina produzida min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A atividade da PPO foi determinada da mesma forma que a da POX, com exceção do H₂O₂ que foi omitido da mistura de reação.

A atividade da FAL foi determinada de acordo com a metodologia proposta por [38], com algumas modificações. A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão borato de sódio 40 mM (pH 8,8) e L-fenilalanina 20 mM em um volume de 1 mL. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30°C durante 1 h. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 50 µL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido transcinâmico foi determinada a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de 100 M⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da FAL [39]. Nas amostras controle, o procedimento foi realizado conforme descrito anteriormente, porém a parada de reação foi realizada imediatamente após a adição do extrato foliar ao meio de reação.

Com exceção da SOD, a atividade das enzimas analisadas foi expressa em base de proteína, cuja concentração foi determinada pelo método de [23].

Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivados da lignina-ácido tioglicólico (DLATG): amostras de 0,1 g de tecido foliar foram maceradas com N₂ líquido, seguida da adição de 1 mL de metanol 80%. A solução permanecerá por 4 h em mesa agitadora a 300 rpm em temperatura ambiente e, posteriormente, será

centrifugada a 17.000 g por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de CFST.

A concentração de CFST foi determinada através do método desenvolvido por [40], com algumas modificações. A reação foi iniciada com a adição de Fenol Folin-Ciocalteu 0,2 M a 150 μ L do extrato de tecido foliar, seguida da incubação a 25°C por 5 min e adição de carbonato de sódio 0,1 M. Essa mistura de reação foi incubada por 10 min a 25°C. Logo após a adição de 1 mL de água deionizada a essa mistura de reação, foi realizada a incubação a 25°C por 1 h. A absorbância será lida a 725 nm e a concentração de CFST foi realizada com base em uma curva de calibração usando ácido gálico como padrão.

Para a mensuração da concentração de DLATG, o pellet foi ressuspendido com 1,5 mL de água deionizada e, após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por 12 h a 65°C. O resíduo alcoólico-insolúvel seco foi usado para determinar a concentração de DLATG conforme descrito por [41]. A absorbância dos DLATG no sobrenadante foi medida a 280 nm e a concentração foi determinada através de uma curva de calibração, na qual se utilizou lignina alcalina éter 2-hidroxipropil como padrão.

Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA): amostras de 0,1 g de tecido foliar foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 \times g, durante 15 min, a 4°C. A uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA) foi adicionado 0,5 mL do sobrenadante, totalizando 1,5 mL. Essa mistura de reação foi incubada em banho maria a 95°C, por 30 min, seguida da parada de reação em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9000 \times g, por 10 min, e a absorbância específica do sobrenadante determinada a 532 nm [34], com algumas modificações). A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em μ mol kg⁻¹ de massa fresca [42].

Histologia

Para caracterização estrutural, o epicótilo e o terceiro e quarto folíolos de eófilos de cinco indivíduos de fenótipos selvagens e albinos de *D. regia*, com 15 dias de idade, foram coletados e fixados em solução Karnovsky [43] por 24 horas. Após esse período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato, desidratado em série etílica de concentração crescente e incluído em historresina (Leica, Alemanha), conforme recomendações do

fabricante. As amostras foram seccionadas transversalmente a 5 μm de espessura com a utilização de navalhas de aço descartáveis de baixo perfil em um micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Científico, China). As secções foram coradas com azul de toluidina (0.05% em tampão fosfato 0.1 M, pH 6.8) [44].

Histoquímica

Para caracterização histoquímica, secções transversais das amostras desidratadas em série etílica de concentração crescente dos folíolos e epicótilo selvagens e albinos foram submetidas floroglucinol [45] para detectar lignina; Lugol para detectar amido; Azul de Toluidina [44] para detecção de fenóis e paredes lignificadas; Sudan para detecção de lipídios [46]; rutênio vermelho [45] para detectar pectina / mucilagem; Xylidine Ponceau [47] para evidenciar proteínas totais; Dicromato de Potássio [48] para detectar fenóis;

Imunocitoquímica

Para a realização das análises imunocitoquímicas, as amostras de epicótilo e dos folíolos de *D. regia* foram submetidos aos mesmos procedimentos de fixação e inclusão descritos anteriormente. Contudo, as secções histológicas foram submetidas ao tratamento com anticorpos monoclonais (Tabela 1). Para detecção de hemiceluloses (LM11, LM15 e LM21) as amostras foram previamente tratadas com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de pectato liase (Sigma-Aldrich) em 2 mM do tampão CaCl_2 , 50 mM do ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanossulfônico (CAPS) (Sigma-Aldrich), pH 10 (Marcus et al. 2008), por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, todas as amostras foram embebidas em uma solução bloqueadora de leite em pó Molico®/ tampão fosfato-salino (PBS), durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpos primários monoclonais JIM5, JIM7, LM1, LM2, LM5, LM6, LM11, LM15 e LM21 (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) (Tabela 1), diluídos 1:10 em leite / PBS por 2 horas. As secções histológicas, então, foram lavadas em PBS, com posterior incubação em anticorpo secundário FITC (1:100 em 3% leite/PBS), por 2 horas na ausência de luz. O controle foi obtido através da supressão da incubação com o anticorpo primário.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais primários e epítomos utilizados durante a análise de compostos de parede de *Delonix regia*.

Anticorpos		Referencias
Monoclonais	Epítomos	

Pectinas homogalacturonanas		
JIM5	Parcialmente (40%) Metil esterificado / sem éster	[49],[50]
JIM7	Parcialmente (15-80%) Metil esterificado	[50]
Pectinas ramnogalacturonanas		
LM5	(1→4)-β-D-galactana	[51]
LM6	(1→5)-α-L-arabinano	[52], [53]
Extensinas		
LM1	Extensina	[54]
Proteína arabinogalactana		
LM2	Proteína arabinogalactana (AGP) glicano	[55], [54]
Heteroxilano		
LM11	(1→4)-β-D-xilano / arabinoxilano	[56]
Xiloglucano		
LM15	XXXG motivo de xiloglucano	[14], [57]
LM21	Heteromanano	[58]

A montagem das lâminas foi realizada em glicerina 50%, após nova lavagem dos cortes em PBS. Para o registro fotográfico utilizou-se o microscópio de fluorescência Leica DM4000 LED acoplado com câmera monocromática HD (DFC3000 G), com comprimento de onda de excitação de 450–490 nm e filtro de emissão de 515 nm. A intensidade da fluorescência foi medida através do programa ImageJ® versão 1.52a (National Institutes of Health, USA). As intensidades de fluorescência dos diferentes epítomos foram avaliadas pela metodologia de grayscale (Gy = grayscale), com análise em triplicata para cada região. Após as medidas, foram propostas as seguintes categorias: (-) negativo (= 0 Gy value); (+) fraco (<15 Gy value); (++) Moderado (15_40 Gy value); (+++) Intenso (40_70 Gy value); (++++) Mais Intenso (>70 Gy value).

Delineamento experimental

Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso consistindo no mínimo 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise média e desvio padrão, as médias foram submetidas a análise de variância e teste t com 5% de probabilidade e aqueles com significância foram marcados com (*) na plotagem dos gráficos. Os gráficos de análise de variância foram construídos em software Origin Pro (Northampton, MA, USA).

RESULTADOS

Germinação, morfologia e fenologia

Quinze dias após a semeadura, 73% das sementes de *Delonix regia* germinaram (Fig. 1a). As plântulas obtidas apresentavam dois fenótipos distintos; Plântulas com folhas verdes (fenótipo selvagem) ou com folhas brancas, caracterizadas como albinas (Fig. 1a). As plântulas albinas representavam cerca de 3% das plântulas obtidas em relação ao total de sementes semeadas (Fig. 1a). Porém, somente 15% das vagens originaram plântulas albinas, sendo que nessas vagens, 16% das sementes deram origem a plântulas com albinismo (Fig. 1a). As plântulas albinas sobreviveram entre 15 a 20 dias após a semeadura e não apresentaram alteração na arquitetura vegetal. Ambos, fenótipos albinos e selvagens, possuíam três eófilos pinados (Fig. 1a).

O albinismo altera o conteúdo de clorofila e a fotossíntese de *D. regia*

As plântulas brancas apresentaram menor conteúdo de clorofila total, em comparação ao homólogo selvagem (Fig. 1b), confirmando a ocorrência de albinismo. As maiores taxas de assimilação líquida de carbono das folhas foram medidas nas folhas de plântulas selvagens de *D. regia* (Fig. 1c), as medições de plântulas albinas têm diferenças no conteúdo de clorofila e no aparelho fotossintético, e taxas de eficiência instantânea do uso de água (Fig. 1h) e transpiração ao vapor de água (Fig. 1e) foram menores, em comparação as plântulas selvagens. Mesmo apresentando maior densidade estomática (Fig. 1f), a condutância estomática (Fig. 1g) também foi menor em plântulas albinas. Em contrapartida, a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) foi maior nas plântulas albinas (Fig. 1d).

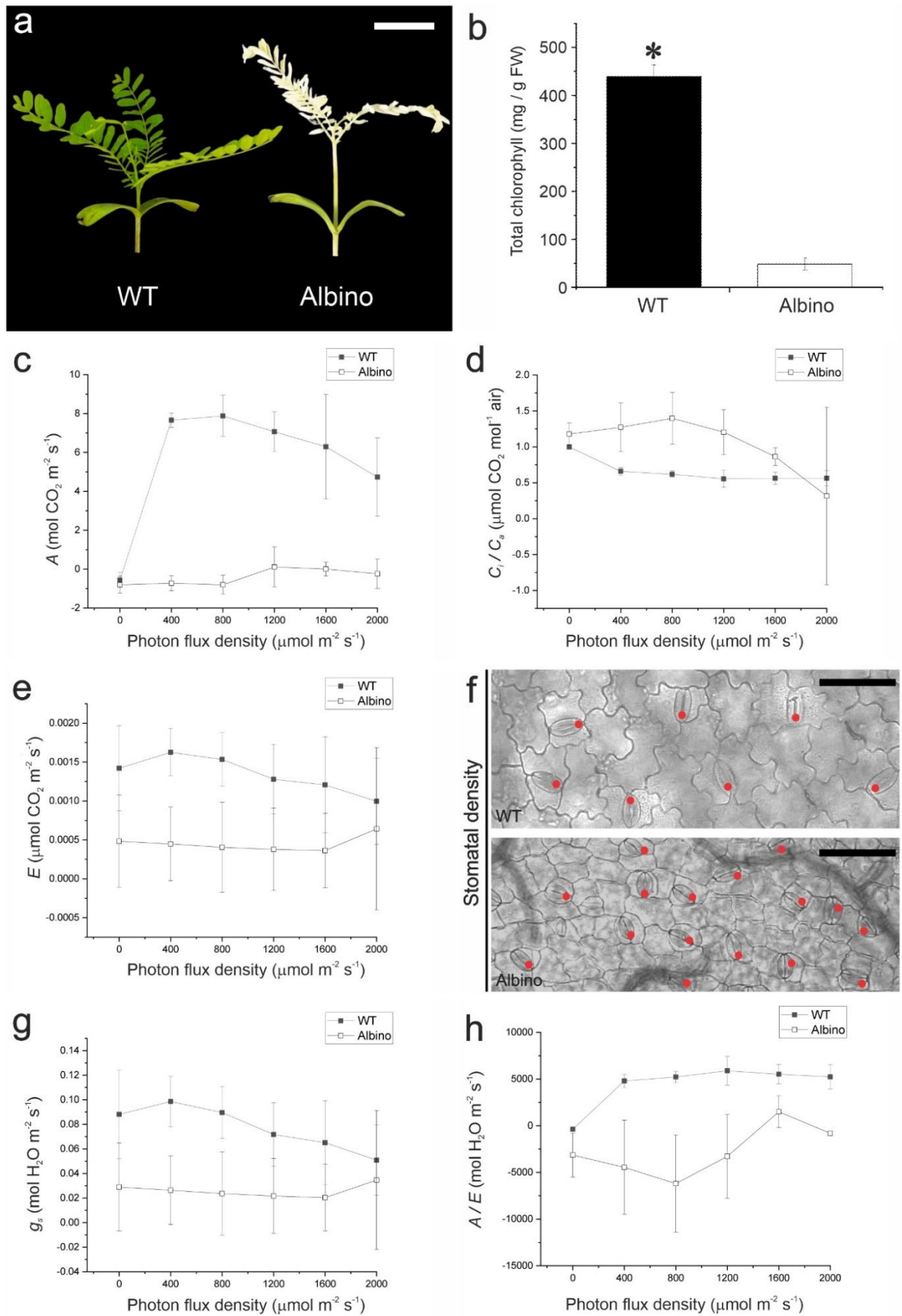


Figura 1: Germinação e morfologia das plântulas selvagem (WT) e albinas de *Delonix regia*. **(a)**; Barra = 1cm. Clorofila total **(b)**; Taxa de assimilação líquida de carbono (A) **(c)**, Razão entre a concentração interna e

concentração externa de CO₂ (C_i/C_a) (**d**), Taxa de transpiração (E) (**e**), Superfície da folha de mudas WT e mudas albinas de *D. regia*, imagens obtida usando microscopia óptica (**f**); condutância estomática (gs) (**g**) eficiência instantânea no uso da água (A/E – razão entre a taxa de assimilação líquida de carbono e a taxa de transpiração de água) (**h**), determinada em folhas de *D. regia* sob Densidade de fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

O albinismo altera o metabolismo de Carbono e de Nitrogênio em plântulas de *D. regia*

Os conteúdos de metabólitos associados ao metabolismo de carbono também foram diferentes nos fenótipos de *D. regia* avaliados (Fig. 2a-f). Plântulas selvagens apresentaram maior conteúdo de glicose (Fig. 2a), frutose (Fig. 2b), sacarose (Fig. 2c) e amido (Fig. 2d, e) em comparação aos seus respectivos homólogos albinos. Consequentemente, o conteúdo de compostos orgânicos, representados no presente estudo pelo malato, também foi maior em plântulas selvagens (Fig. 2f). Entretanto, as plântulas albinas apresentaram conteúdo maior de proteínas solúveis (31,8%) e aminoácidos (65,3%), em relação ao homólogos selvagens (Fig. 2g, h, i).

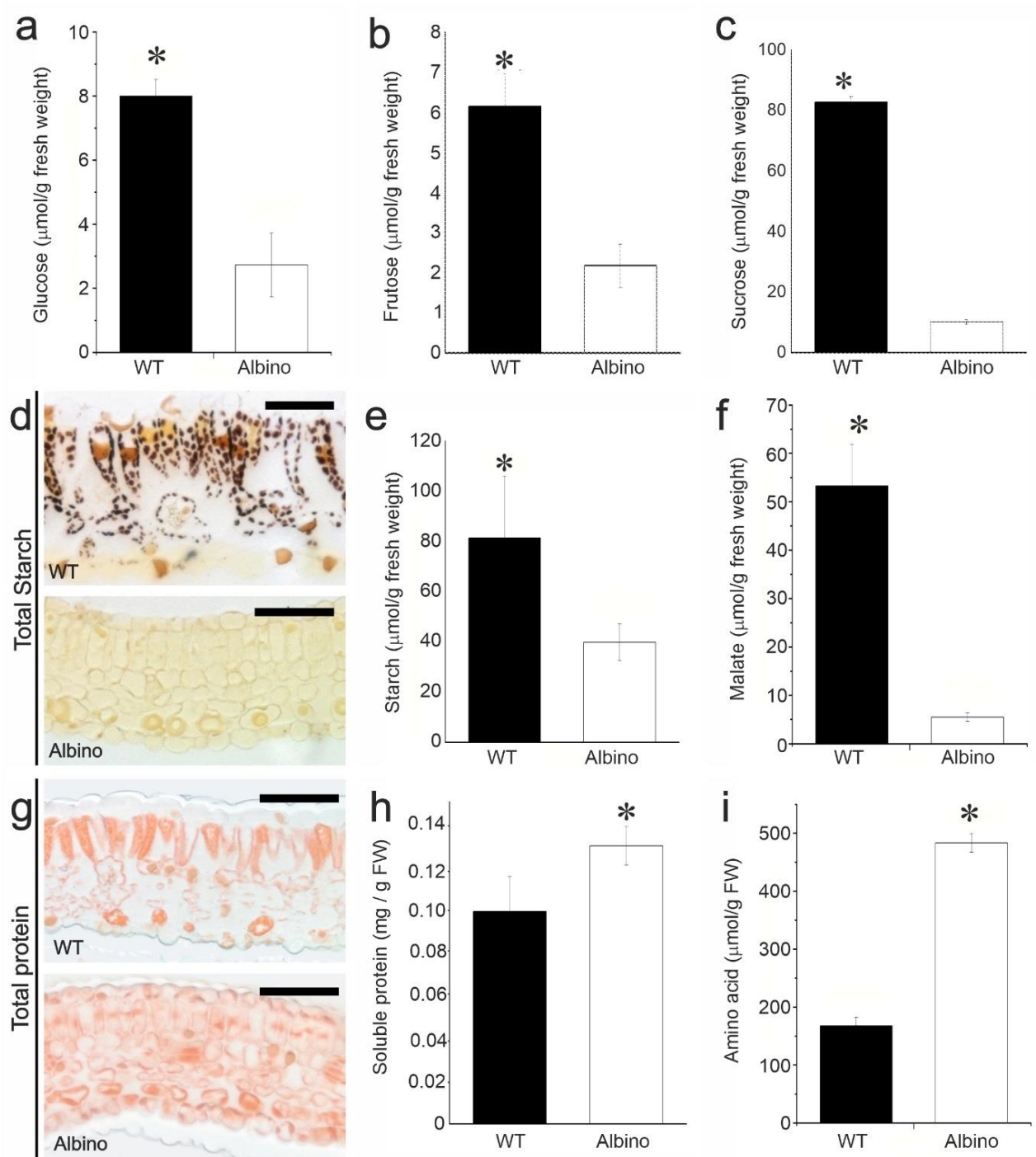


Figura 2: Metabolismo de Carbono e Nitrogênio de plântulas selvagens (WT) e albinas de *Delonix regia*. (a-i); glicose (a); frutose (b); sacarose (c); histoquímica de amido com Lugol (O'Brien, Feder e McCully, 1964) (d); total de amido (e); malato (f); histoquímica do conteúdo total de proteínas com Xylidine Ponceau (VIDAL, 1970) (g); total de proteína solúveis (h); aminoácido (i). Médias com um asterisco são diferentes de acordo com o teste t a 5% de probabilidade. As barras de erro denotam o desvio padrão. Barras = 50 μm .

O albinismo altera a concentração de macro e micronutrientes foliares em plântulas de *D. regia*

As concentrações foliares de nutrientes foram diferentes nos fenótipos de *D. regia*

avaliados (Fig. 3). Os teores da maioria dos macronutrientes e micronutrientes foram maiores nas plântulas albinas, à exceção de K (Fig. 3c), Ca (Fig. 3d) e Mn (Fig. 3h).

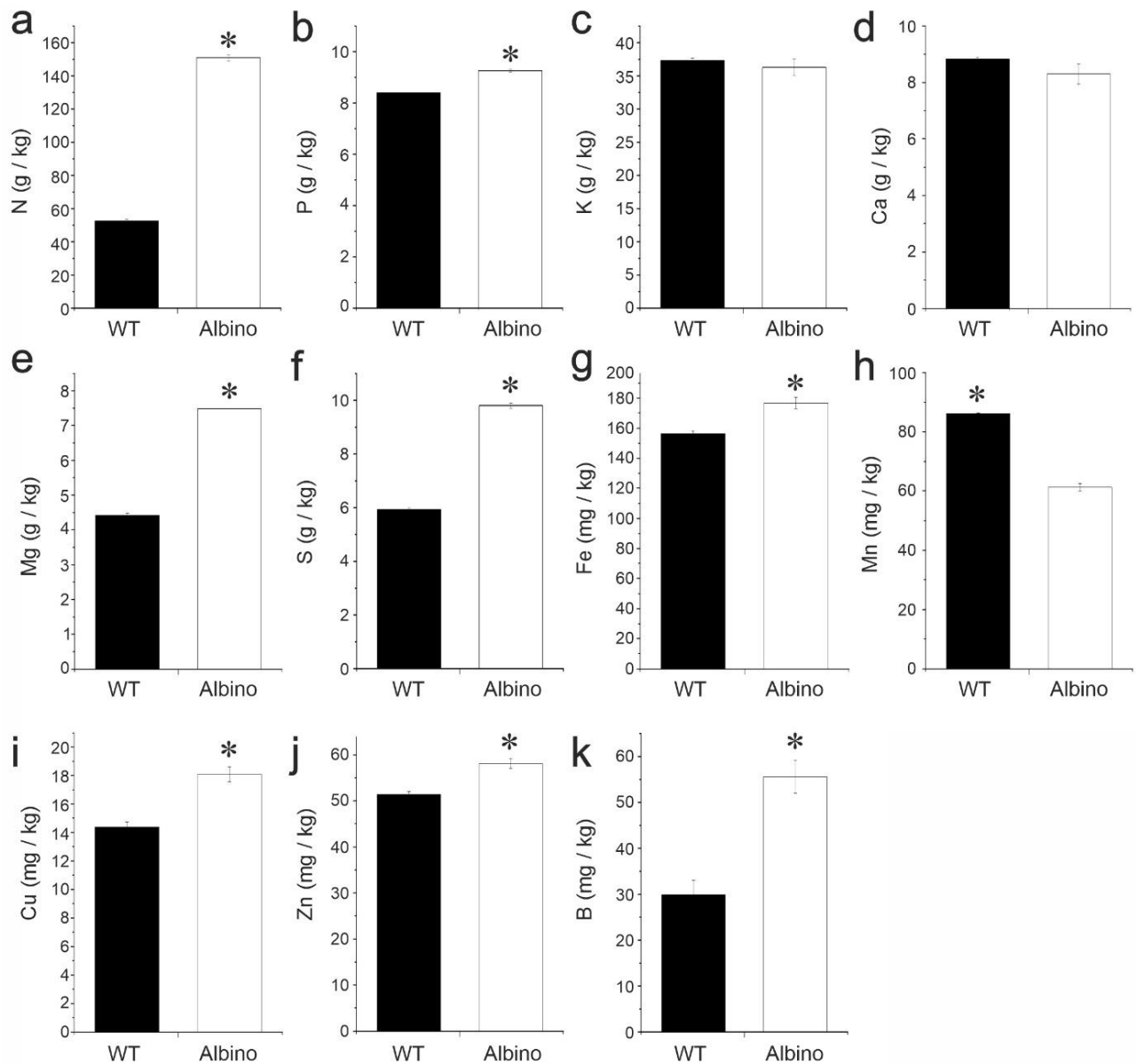


Figura 3: Teores das concentrações foliares dos macronutrientes (a-f): nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e micronutrientes (g-k), ferro (Fe), Manganês (Mn), Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Boro (B) em *Delonix regia*. Médias com um asterisco são diferentes de acordo com o teste t a 5% de probabilidade. As barras de erro denotam o desvio padrão.

O albinismo influencia na atividade enzimática e peroxidação de lipídios

A atividade enzimática das plântulas albinas estão em níveis alterados com suas contrapartes verdes, as análises revelaram alterações na atividade de dismutase do superóxido (SOD) e atividades de enzimas peroxidase (POX) com valores maiores nas amostras selvagens

de *D. regia*, logo os resultados da atividade de catalase (CAT), de concentração de aldeído malônico (MDA) e atividade de peroxidase do ascorbato (APX) foram maiores nas amostras albinas, os resultados demonstram estresse e peroxidação lipídica nas plântulas albinas de *D. regia*.

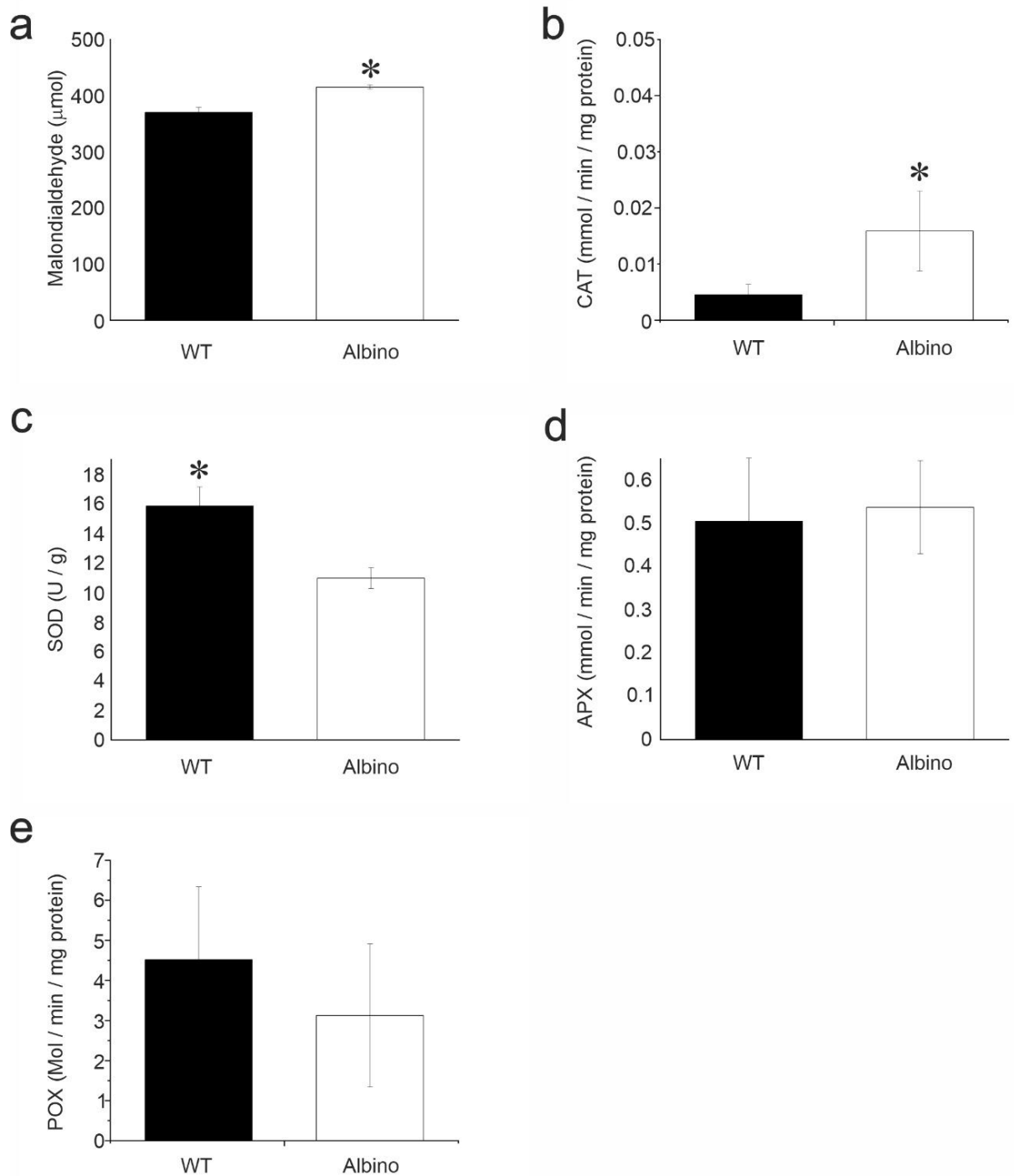


Figura 4: Atividade enzimática de plântulas selvagens (WT) e Albinas de *Delonix regia*. concentração de aldeído malônico (MDA) (a); Atividade de Catalase (CAT) (b); Atividade de Dismutase do Superóxido (SOD) (c); Atividade de Peroxidase do Ascorbato (APX) (d); Atividades de enzimas peroxidase (POX) (e). Médias com um asterisco são diferentes de acordo com o teste t a 5% de probabilidade. As barras de erro denotam o desvio padrão.

O albinismo reduz a lignificação dos tecidos vegetativos

Na caracterização qualitativa e quantitativa dos teores de lignina e fenóis feita através dos testes histoquímicos e bioquímicos percebe-se que as plântulas selvagens possuem maior teor de lignina e fenóis em sua estrutura caulinar, nas fibras e no xilema (fig. 5 c-f) através dos testes feitos com floroglucinol, e nas folhas através dos testes bioquímicos (fig. 5 e), nos testes bioquímicos observa-se que as plântulas selvagens possuem maior atividade enzimática FENILALANINA AMÔNIA-LIASE (PAL) e Atividade de polifenoloxidase (PPO) nas folhas (fig. 5 a-d), demonstrando sua capacidade de lignificação em relação aos seus pares albinos nas amostras selvagens.

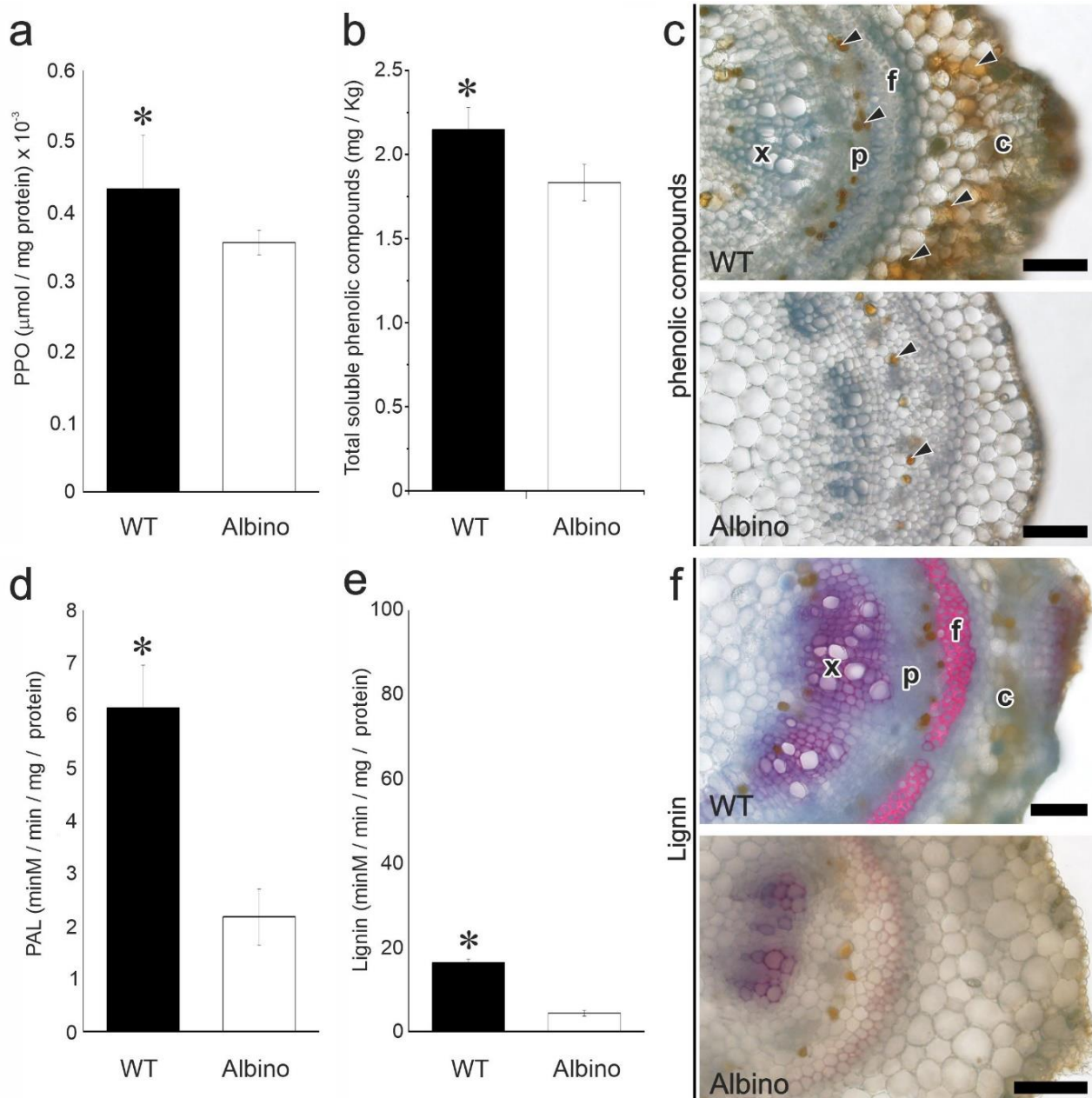


Figura 5: Atividade de polifenoloxidase (PPO) (a), quantificação dos teores de concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) (b); Caracterização histoquímica para detecção fenóis com Dicromato de Potássio (Gabe 1968) (c); Atividades de enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) (d); Derivados da Lignina-Ácido Tioglicólico (DLATG) (e); Caracterização histoquímica para detecção de Lignina e com Floroglucinol (Johansen 1940) (f) em *Delonix regia*.

O albinismo influencia na anatomia e na deposição de parede celular de *D. regia*

Alterações na estrutura foliar e caulinar foram observados em plântulas albinas de *D. regia*. Os folíolos de plântulas selvagens são constituídos por uma epiderme unisseriada, hipostomática e mesófilo dorsiventral, consistindo em uma camada de parênquima paliçádico e duas a quatro camadas de parênquima lacunoso (Fig. 6a). Nas plântulas albinas, os folíolos

apresentaram-se, aparentemente, mais espessos e hipertrofiados no parênquima clorofiliano. O parênquima paliçádico era formado por células aparentemente mais volumosas e o parênquima lacunoso era compacto com poucos espaços intercelulares (Fig. 6b).

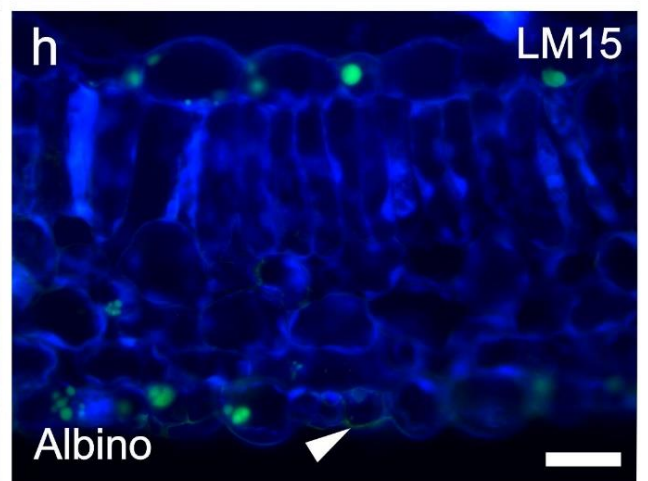
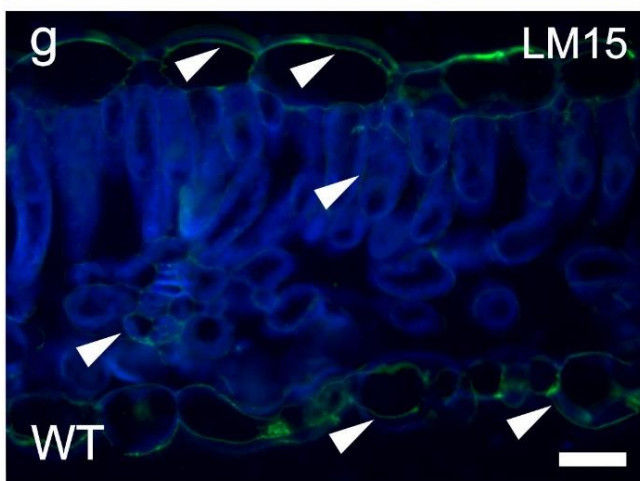
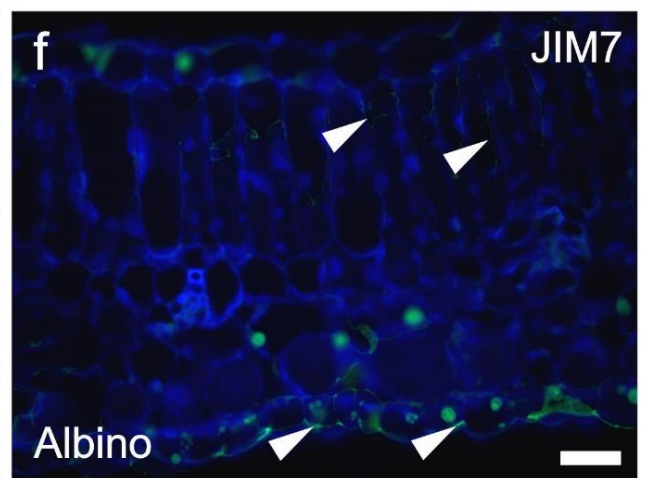
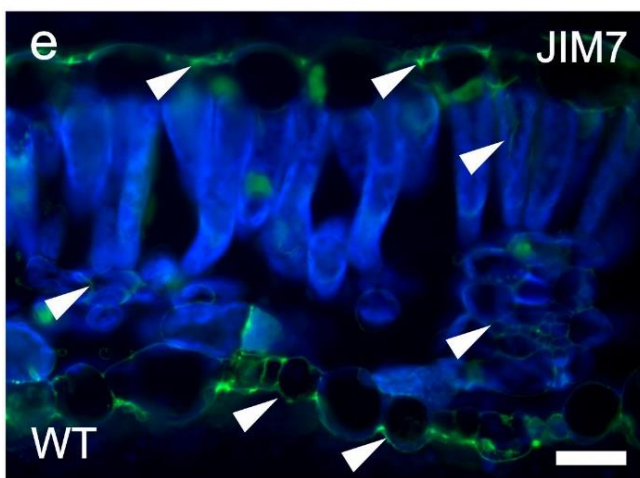
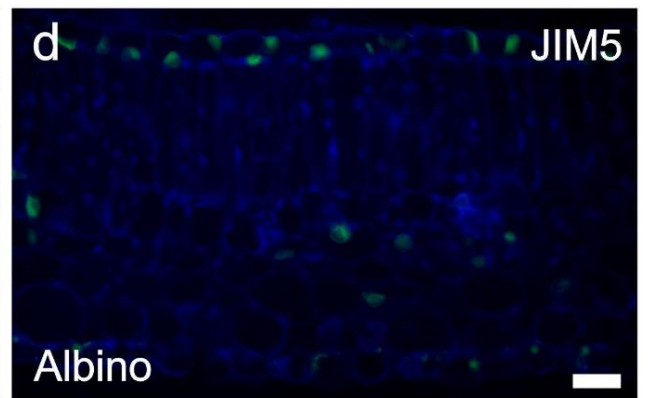
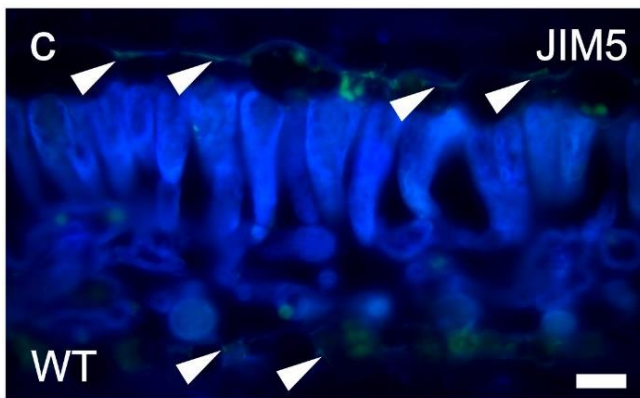
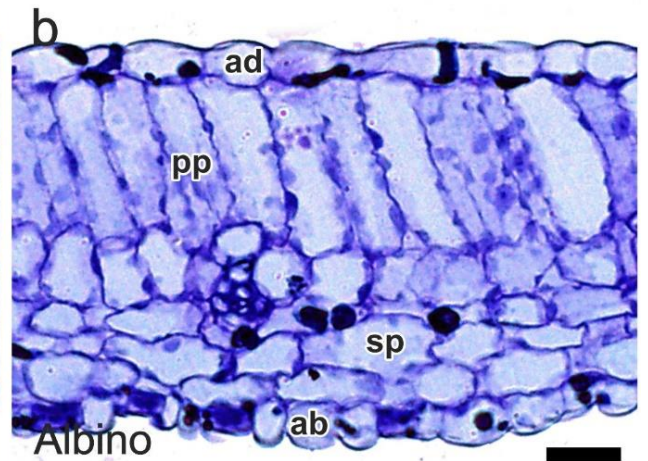
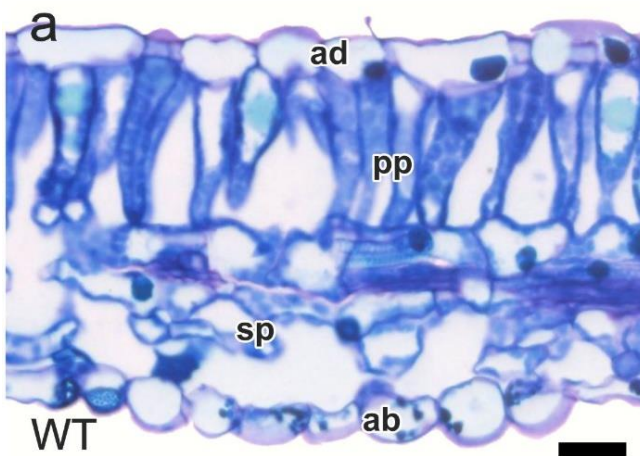


Figura 6: Caracterização anatômica e imunocitoquímica da região internerval de folíolos de plântulas selvagens (WT) e albinas de *Delonix regia*. Secções transversais de plântulas selvagens (**a, c, e, g**) e albinas (**b, d, f, h**). Imagens coradas com azul de Toluidina (**a, b**) e marcadas com os anticorpos monoclonais JIM 5 (**c, d**), JIM 7 (**e, f**) e LM 15 (**g, h**). A detecção dos epítomos é indicada pela fluorescência verde (cabeça de seta). Abreviações: *ad* face adaxial da epiderme, *ab* face abaxial da epiderme, *pp* parênquima paliçádico, *sp* parênquima lacunoso. Barras = 25 µm.

Nos folíolos de plântulas selvagens, epítomos de HG de alta metil-esterificação, reconhecido pelo anticorpo JIM5, foram marcados nas paredes de células da região da epiderme, (Fig. 6c, d). Nas plântulas albinas, também foram observadas autofluorescência nessa região. Porém, nas plântulas albinas as marcações apresentaram menor intensidade (Fig. 6c, d; Tabela 2). Nos folíolos de plântulas selvagens, epítomos de JIM 7, foram marcados nas paredes de células da região da epiderme abaxial e adaxial e mesofilo (Fig. 6e, f). Nas plântulas albinas, também foram observadas marcações nessa região. Porém, nas plântulas albinas as marcações apresentaram menor intensidade (Fig. 6e, f; Tabela 2). Análises do epítomo de xiloglucano (LM 15), evidenciaram marcações nas folhas de *D. regia* na região da epiderme abaxial e adaxial de plântulas selvagens (Fig. 6g) e na região abaxial das plântulas albinas (Fig. 6h).

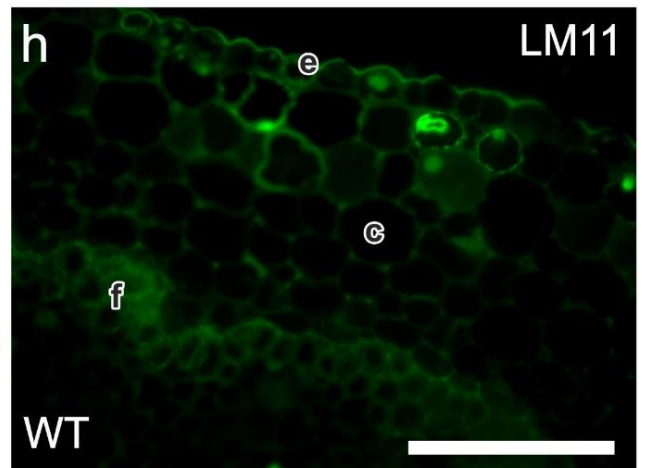
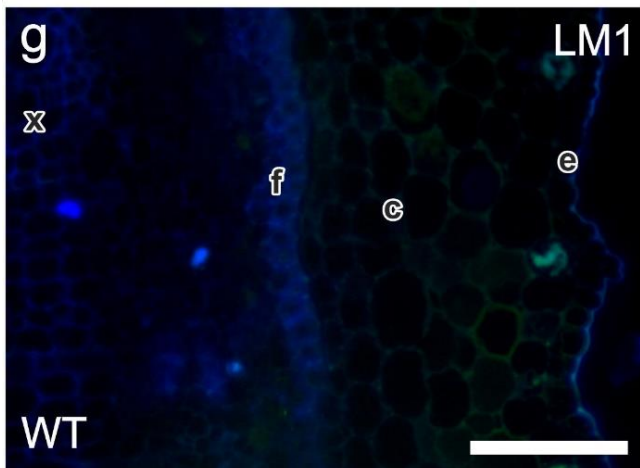
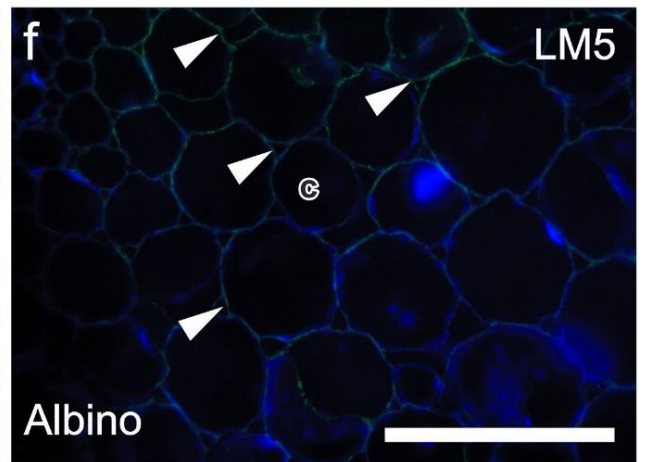
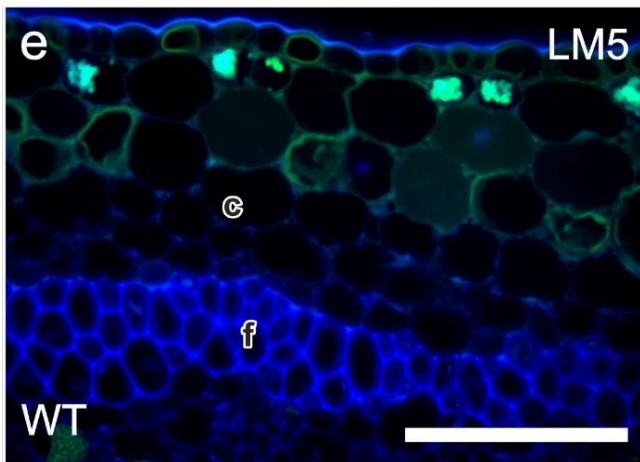
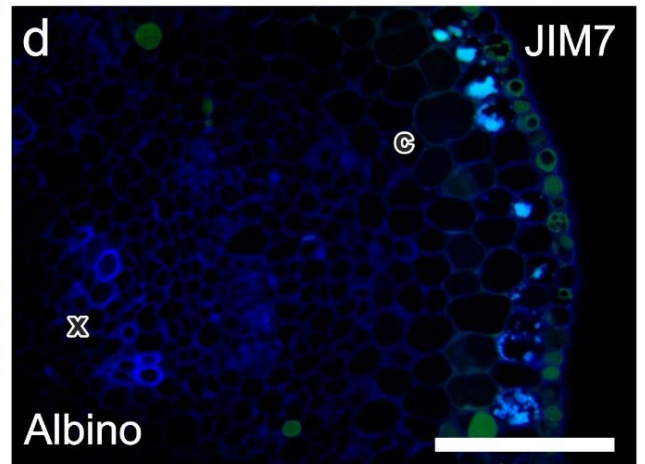
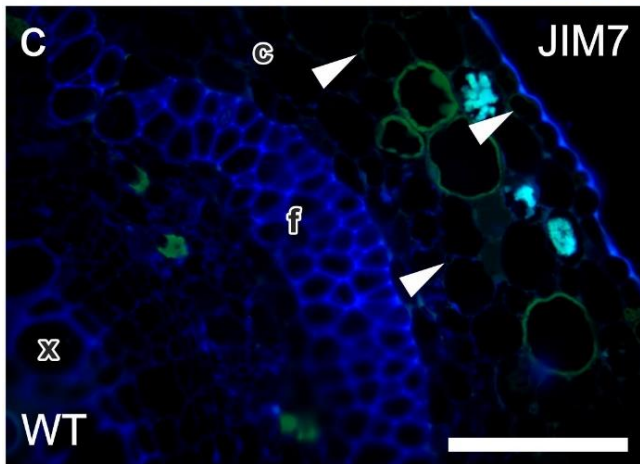
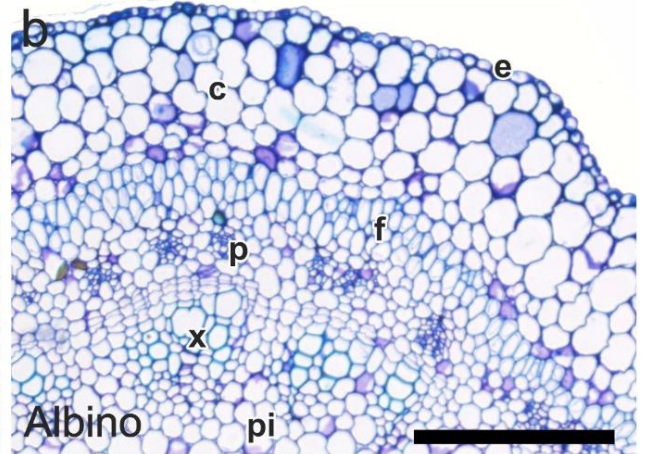
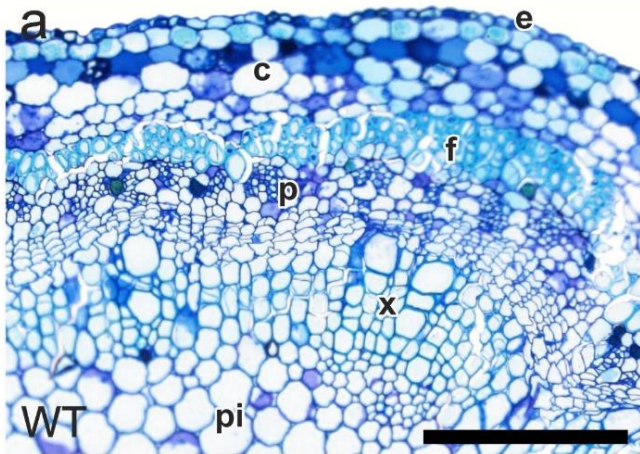


Figura 7: Caracterização anatômica e imunocitoquímica de epicótilos de plântulas selvagens (WT) e albinas de *Delonix regia*. Secções transversais de plântulas selvagens (**a, c, e, g**) e albinas (**b, d, f, h**). Imagens coradas com azul de Toluidina (**a, b**); marcadas com o anticorpo monoclonal JIM 7 (**c-d**); marcadas com o anticorpo monoclonal LM 5 (**e-f**); marcadas com o anticorpo monoclonal LM 1 e LM 11 (**g-h**). A detecção dos epítomos é indicada pela fluorescência verde. Abreviações: *c* córtex, *e* epiderme, *f* fiber, *p* floema, *pi* medula, *x* xilema. Barras = a, b 200 µm; c – h 25 µm.

Os epicótilos das plântulas selvagens e albinas de *D. regia* apresentaram a mesma organização histológica, sendo constituídos por uma epiderme unisseriada, córtex composto por 5-7 camadas de parênquima de preenchimento e uma camada de fibras, feixes vasculares do tipo colateral e a medula composta por parênquima de preenchimento (Fig. 7a, b). A instalação do câmbio vascular também foi notada em ambos os fenótipos estudados. Contudo, nas plântulas albinas os tecidos vasculares e de sustentação apresentaram menor diferenciação e lignificação (Fig. 7a, b). O epicótilo selvagem, apresentou marcações de epítomos pécticos (JIM7) na região da epiderme e do córtex, diferente do epicótilo albino que apresentou em baixa intensidade apenas no córtex, na mesma proporção seguem as marcações com o epítomo (JIM7), como demonstrado na tabela de reação. As marcações do epítomos (LM5) e (LM11) apresentaram poucas marcações na região do córtex e na epiderme, tanto nas amostras selvagens quanto nas albinas, as marcações do epítomo (LM1) foram observadas na região do córtex, na epiderme e nas fibras do epicótilo selvagem, no epicótilo albino foi observado apenas no córtex. O epítomo (LM11) apresentou poucas marcações na região da epiderme e córtex do epicótilo selvagem.

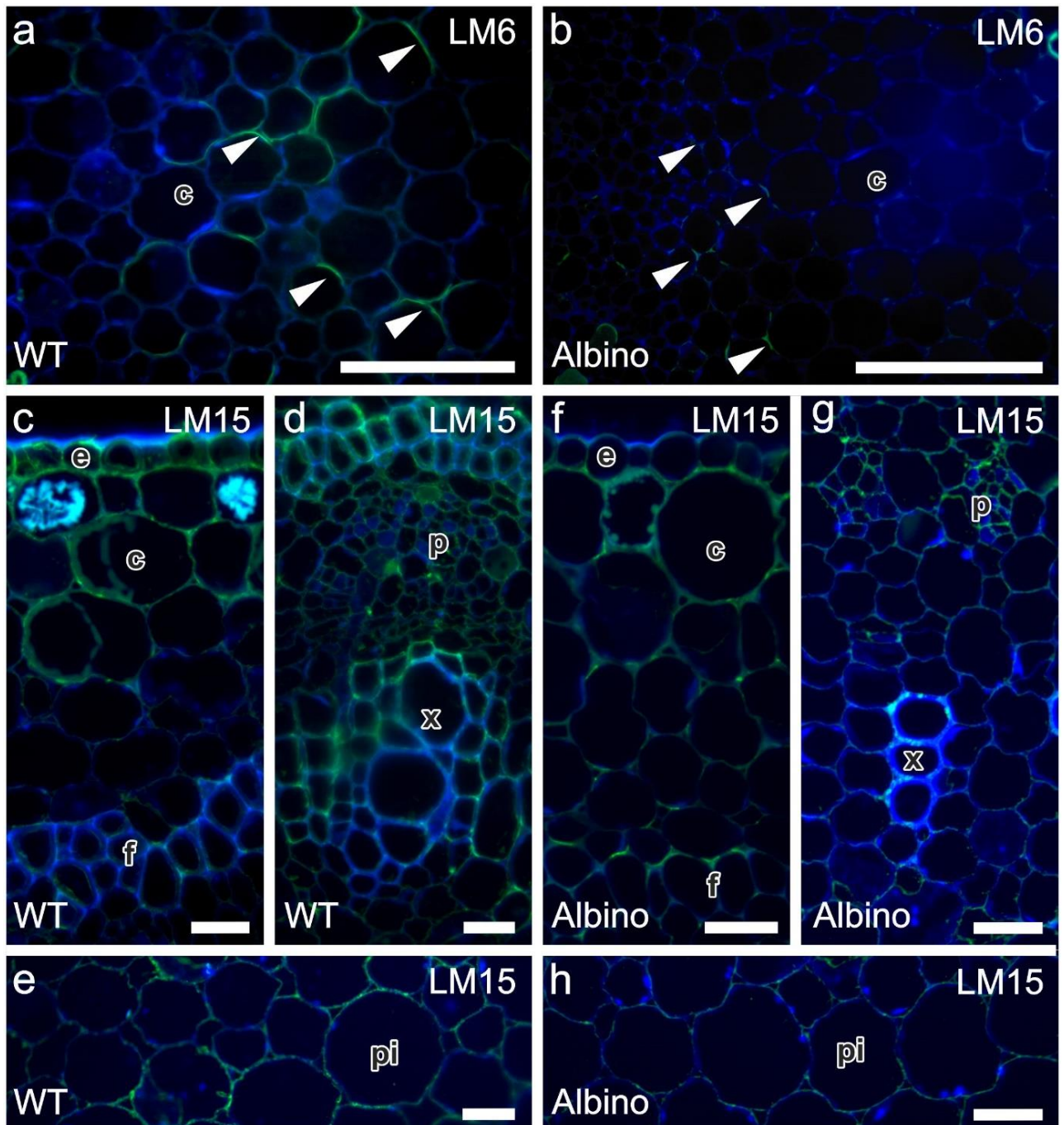


Figura 8: Caracterização anatômica e imunocitoquímica da região da nervura mediana de folíolos de plântulas selvagens (WT) e albinas de *Delonix regia*. Secções transversais de plântulas selvagens (**a, c, d, e**) e albinas (**b, f, g, h**). Imagens coradas com azul de Toluidina (**a, b**) e marcadas com os anticorpos monoclonais LM 6 (**a, b**) e LM15 (**c,d,e, f,g,h**). A detecção dos epítomos é indicada pela fluorescência verde (cabeça de seta). Abreviações: *c* córtex, *e* epiderme, *f* fiber, *p* floema, *pi* medula, *x* xilema. Barras = 25 μ m.

A região da nervura mediana dos folíolos selvagens e albinos de *D. regia* possuíam formato convexo e eram compostas por epiderme unisseriada, parênquima paliçádico voltado para a face adaxial, parênquima fundamental na face abaxial da lâmina foliar e feixe vascular do tipo colateral na posição central (Fig. 8c, d, f, g). Porém, as plântulas selvagens

apresentavam, aparentemente, maior diferenciação dos tecidos vasculares (Fig. 8c, d). Como observado na região internerval, tanto o epítipo de HG de alta metil-esterificação de xiloglucano (LM15) apresentaram marcações menos intensas nas plântulas albinas (Fig. 8 f, g; Tabela 2). Outra região analisada e com marcações do epítipo de xiloglucano (LM 15) foi a do feixe vascular, com marcações no parênquima de preenchimento das plântulas selvagens (Fig. 7 c, d). Algumas células do cortex de plântulas selvagens também apresentaram sinais do epítipo pécticos (LM 6) (Fig. 7a), característica pouco percebida nas células do cortex de plântulas albinas (Fig. 7b).

Tabela 2 - Intensidade de reação dos epítipos em folíolos e epicótilos de plântulas selvagens (WT) e albinas (Albino) de *Delonix regia*.

Anticorpo monoclonal	Intensidade de Fluorescência											
	Folíolos WT					Folíolos albinos						
	ad	pp	fv	sp	ab	ad	pp	fv	sp	ab		
JIM5	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
JIM7	++++	+++	++	+++	++++	+++	++	++	++	++		
LM6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LM11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LM15	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++		
LM21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Anticorpo monoclonal	Epicótilos WT						Epicótilos albinos					
	ep	co	p	vc	fi	pi	ep	co	p	vc	fi	pi
JIM5	++	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
JIM7	++	++	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-
LM5	++	++	-	-	++	-	++	++	-	-	-	++
LM6	++	++	-	-	++	-	++	++	++	-	-	++
LM1	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
LM2	++	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
LM11	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
LM15	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	-	+++	++
LM21	++	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-

Escala de intensidade de marcação: (-) negativo (= 0 Gy value); (+) fraco (<15 Gy value); (++) moderado (15_40 Gy value); (+++) intenso (40_70 Gy value); (++++) mais Intenso (>70 Gy value). Abreviações: *ad* face adaxial da epiderme, *ab* face abaxial da epiderme, *ep* epiderme, *co* cortex, *p* floema, *pi* medula, *pp* parênquima paliçádico, *sp* parênquima lacunoso, *x* xilema, *vc* câmbio vascular, *fi* fibras, *fv* feixe vascular.

Discussão

Estudos recentes de espécies com ausência de clorofila evidenciaram que existem alterações significativas na anatomia e na fisiologia de plantas albinas [6, 10, 11]. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram essas evidências e demonstram que o metabolismo e estrutura de plântulas de *Delonix regia* foram alteradas em decorrência do albinismo.

Os dados de germinação evidenciaram que apenas de 3% das sementes originaram plântulas albinas. A ocorrência de albinismo por vagem, foi consideravelmente maior, cerca 16% das sementes presentes em uma vagem apresentou albinismo, sendo que, somente 15% das vagens semeadas apresentaram albinismo, evidenciando que a ocorrência de albinismo está restrita a um ou poucos ramos do indivíduo, corroborando a ideia que o albinismo é uma característica recessiva por natureza [10].

Os resultados das análises de metabolitos primários ligados ao metabolismo do nitrogênio reforçam as diferenças encontradas entre as plantas de *D. regia* selvagens e albinas já descritas por [6]. A redução dos pigmentos de clorofila desencadeia mudanças e danos ao aparelho fotossintético nas folhas de plântulas de *D. regia* albino, e reduziram drasticamente a capacidade de produção de compostos fotossintéticos e conseqüentemente sua atividade fotoquímica, conforme avaliado na quantificação da clorofila *a*. A diminuição do teor de clorofila nas folhas de plântulas de *D. regia* albino implica em redução na eficiência quântica, pois a clorofila é responsável pela absorção de luz na primeira etapa da formação de energia química [59].

Os valores de aminoácidos encontrados nas análises de perfil metabólico trazem uma posição ainda complexa sobre a relação de aminoácidos e a formação de proteínas nas plântulas albinas de *D. regia*, pois, as leituras foram maiores do que as encontradas nas plântulas selvagens. A quantidade de nitrogênio absorvida, que influencia na produção de aminoácidos e proteínas varia durante o ciclo de desenvolvimento da planta, em função da quantidade disposta [60]. Uma possível explicação para as altas as taxas de aminoácidos nas plântulas albinas seria a alteração na síntese de clorofila por conta da mutação genética, em que há alta concentração de aminoácidos nas folhas e isso pode reprimir a absorção de Nitrogênio (N), essa alta concentração inibe a exportação de aminoácidos para o floema resultando a não degradação de proteínas [61]. A deficiência de açúcares encontrada nas plântulas albinas de *Delonix regia* reforça a importância do mecanismo fotossintético para formação de substratos energéticos, as enzimas ligadas ao ciclo de Calvin-Benson e a maior parte das trioses fosfato estão apoiadas na restauração das concentrações adequadas dos intermediários metabólicos quando as folhas

recebem luz [13], logo com a ausência da clorofila nas plântulas albinas de *Delonix regia* esse processo é ausente ou deficitário, proporcionando danos ao aparelho fotossintético [6].

Nas análises feitas em folhas de *Delonix regia*, encontraram folhas selvagens com maior diferenciação celular em relação às folhas das plântulas albinas, conforme previamente observado em [6]. A organização do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso nas folhas de *Delonix regia* selvagens apresentam padrão característico da espécie, já nas plântulas albinas, as folhas apresentam alterações nos parênquimas paliçádico e lacunoso, sendo claramente maior adensamento celular e redução da área foliar. O albinismo ocorre por bloqueio na biogênese do cloroplasto, resultando em falha no desenvolvimento adequado de fotossistemas contendo clorofila nos tilacoides [10]. Acredita-se que o albinismo interfere no conteúdo de clorofila e conseqüentemente no desenvolvimento de tecidos e no desenvolvimento de células do parênquima paliçádico que estão relacionadas com o conteúdo de clorofila [1].

Nas análises do aparelho fotossintético de *D. regia* observaram que a deficiência da clorofila afeta diretamente a relação fotossíntese e desenvolvimento, logo sua capacidade de desempenhar sua função na recepção, transporte e assimilação de CO² foi afetada, trazendo danos na eficiência fotossintética [3]. Neste mesmo sentido, os danos causados pela deficiência no aparelho fotossintetizador demonstra relação com baixa produção de polissacarídeos essenciais a planta e seu desenvolvimento celular no ciclo de Calvin-Benson [19]. Plantas com deficiência em polissacarídeos foram relatadas como plantas com possibilidade de cavitação e embolia por conta da deficiência na formação de parede celular [17, 20].

Ainda nas análises do aparelho fotossintético, os valores encontrados de condutância estomática, eficiência do uso da água e transpiração demonstram relação com a ineficiência hídrica [18] e na absorção de nutrientes [62] de plantas albinas, nas análises relacionadas aos dados de macro e micronutrientes, os resultados apresentam relação entre a disposição e quantidade desses nutrientes nas folhas albinas e suas contrapartes verdes, já que há adensamento celular nas folhas albinas de *D. regia* [6]. Estas alterações estariam interligadas com o albinismo e seus reflexos anatômicos e fisiológicos, estes resultados também mostram uma ótica diferente em relação a espécie avaliada, pois os resultados mencionados são diferentes em relação aos dados encontrados em estudos com *Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) [11], em que avaliaram galhos albinos, os resultados evidenciaram que a plântula albina tem alterações diferentes de galhos albinos em relação a condutância estomática e transpiração, por ser especificamente avariada sua capacidade fotossintética, embora novas análises sejam necessárias para confirmar essa hipótese.

O epicótilo das plântulas selvagens de *D. regia* também apresentaram maior diferenciação celular em relação aos seus pares albinos, característica evidente pela menor diferenciação das células que apresentam deposição de parede secundária e lignificação na maturidade. [11] evidenciaram que ramos albinos de sequoia apresentaram menor eficiência no transporte de água que seus homólogos selvagens e correlacionaram essa característica a menor lignificação dos tecidos vasculares e maior densidade estomática encontrada nas folhas dos ramos albinos. Considerando os resultados obtidos aqui e a maior densidade estomática nas plantas albinas de *D. regia* [6], acreditam que o transporte de água nesses indivíduos podem, também, ser prejudicados, embora novas análises sejam necessárias para confirmar essa hipótese.

A dinâmica da composição da parede celular atribui importantes papéis na relação estrutural e funcional dos tecidos durante o desenvolvimento da folha. As evidências encontradas nas análises de imunocitoquímica nos levam a relacionar a composição de parede celular com ineficiência com o albinismo em *D. regia*. Epítomos de JIM7, de alto metil esterificados foram encontrados nas folhas de *D. regia*. O mesofilo das plântulas selvagens demonstrou-se mais diferenciado que as plântulas albinas de *D. regia*. Interessantemente, pectinas foram marcadas ao longo de todo mesofilo das plântulas selvagens e, em menor intensidade nas plântulas albinas, e pode estar associado ao adensamento celular observado nesse fenótipo. As marcações de JIM 7, em geral, estão associadas à regulação do crescimento celular, adesão, elasticidade e porosidade da parede celular [65, 66].

As marcações diferenciais de epítomo de xiloglucano LM 15 na região da nervura mediana de plântulas selvagens e albinas podem caracterizar possível posição de subdesenvolvimento e menor capacidade do xilema das plântulas albinas, tornando-a potencialmente insensível aos processos de afrouxamento da parede [63]. Conseqüentemente este subdesenvolvimento da capacidade hídrico de plântulas albinas se relaciona com as alterações anatômicas e fisiológicas encontradas nas análises do aparelho fotossintético e potencial hídrico, abordando a relação entre o albinismo e parede celular. O xiloglucano tem papel significativo para o processo de extensão da parede celular [67] que pode atuar como agente aglutinante para conectar as microfibrilas, funcionando como ‘hotspots biomecânicos’ no suporte de carga [15, 63].

As marcações na região do córtex dos epicótilos com epítomo de xiloglucano LM 15 retrata posição de estágio diferente entre as plântulas selvagens de *D. regia* em relação as plântulas albinas, caracterizando possível estágio de limitação da expansão celular nas plântulas

albinas, sugerindo nas plântulas albinas um estágio de estresse da plântula de forma precoce [15]

A concentração de teores de lignina demonstrados nos resultados histoquímicos e bioquímicos corroboram com a observação referente ao albinismo e lignificação em amostras de *D. regia*. Os resultados apresentam maior lignificação das plântulas selvagens em relação as albinas, configurando deficiência na síntese de lignina, alterando formação de parede celular, xilema, floema e todo o aparato de defesa da amostra albina. A lignina é um polímero hidrofóbico e apesar de ter baixa resistência à tração confere rigidez à parede celular ao manter a celulose livres de água, e a lignina também é um agente de volume, aumentando a resistência à compressão das células [17]. Do ponto de vista do desenvolvimento, a deposição de lignina, na matriz de parede de celulose, pectina e proteína da parede secundária é o passo final para aumentar a rigidez e a resistência à compressão da célula, bem como sua impermeabilidade à água [18].

A síntese de lignina envolve fenilalanina amônia-liase, (PAL) e peroxidase (POX), e a PAL, ao catalisar a desaminação da fenilalanina para transcinamato, controla o acúmulo de lignina nas plantas, enquanto o peroxidase (POX) catalisa a polimerização do monolignol para completar o processo de lignificação. Embora essas enzimas façam parte da via de lignificação, a extensão em que podem regular a via é diferente em diferentes tecidos e ainda não está clara [22]. A PAL é muito importante no metabolismo secundário das plantas, promovendo a primeira etapa enzimática que converte a L-fenilalanina em ácido transcinâmico, e posteriormente em compostos fenólicos [68]. A PAL tem influência direta no acúmulo de lignina [22].

O principal papel da POX seja sua contribuição para a biossíntese da lignina, ela também participa da suberização tecidual, reticulação de proteínas estruturais da parede celular, catabolismo de auxina, regulação da senescência e defesa de patógenos de plantas [69]. A peroxidação de lipídios encontrada nas análises bioquímicas de concentração de aldeído malônico (MDA) evidenciam estimativa do estresse oxidativo por um parâmetro bioquímico, já que o (MDA) é o composto resultante da peroxidação lipídica, gerada pelo estresse e sua alteração evidencia também danos celulares [70].

Uma forte linha de evidência que apoia a ideia que a lignina influencia a resistência à embolia vem do trabalho com mutantes e plantas transgênicas. Foi demonstrado que mutantes deficientes em lignina podem ter maior vulnerabilidade à embolia. Embora os mutantes deficientes em lignina mostrem maior vulnerabilidade à embolia, os efeitos funcionais da variação natural no teor de lignina não são conhecidos [17].

O ganho reduzido de carbono de plântulas albinas de *D. regia* devido as notórias dificuldade de realizar suas atividades fotossintéticas e conseqüentemente de geração de produtos e subprodutos ligados ao ciclo de Calvin – Benson teve um profundo impacto na formação de parede celular e logo a qualidade do xilema [11], ligando pontos entre polissacarídeos [19], lignificação [71], resistência hídrica [16] e disposição de nutrientes [60].

Conclusão

As análises obtidas permitiram verificar que *D. regia* possuiu morfologia e fisiologia alterados pelo albinismo. Conjuntamente, os estudos realizados nas plântulas albinas, demonstram que esta espécie sofre alterações significantes em relação as suas contrapartes verdes. O albinismo provoca mudanças na fisiologia e metabolismo de *D. regia*, proporcionando diversas relações com a ausência das clorofilas. Os reflexos observados demonstram a grande necessidade de continuidade de estudos relacionados ao albinismo, observando cada vez mais as dinâmicas fisiológicas dos indivíduos com essa alteração genética.

O albinismo é uma consequência irreversível, porém podem usar essa situação para entender melhor todos os aspectos e funções alteradas pelo albinismo. Pois, o albinismo provoca alterações no conteúdo celular, na formação de parede celular e no comportamento fisiológico de *D. regia*. Alterações comprovadas e discutidas nesta pesquisa, ainda identificaram possibilidades de investigação em relação aos impactos reservados ao albinismo em *D. regia*.

Referências Bibliográficas

- [1] N. Tiller, R. Bock, The translational apparatus of plastids and its role in plant development, *Mol Plant*, 7 (2014) 1105-1120.
- [2] Q.S. Chang, L.X. Zhang, X.G. Hou, Z. Wang, N. Wang, M.G. Gong, Q.M. Zhang, H. Chen, Z.Q. Shi, C.C. Deng, The anatomical, physiological, and molecular analysis of a chlorophyll-deficient mutant in tree peony (*Paeonia suffruticosa*), *Photosynthetica*, 57 (2019) 724-730.
- [3] C. Dubreuil, X. Jin, J.d.D. Barajas-López, T.C. Hewitt, S.K. Tanz, T. Dobrenel, W.P. Schröder, J. Hanson, E. Pesquet, A. Grönlund, I. Small, Å. Strand, Establishment of Photosynthesis through Chloroplast Development Is Controlled by Two Distinct Regulatory Phases, *Plant Physiology*, 176 (2017) 1199-1214.
- [4] N. Tiller, M. Weingartner, W. Thiele, E. Maximova, M.A. Schottler, R. Bock, The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins, *Plant J*, 69 (2012) 302-316.
- [5] H.B. Smith, Photosynthetic Pigmentation—Variegations on a Theme, *The Plant Cell*, 11 (1999) 1-3.
- [6] L.A.S. Silva, V.F. Sampaio, L.C.S. Barbosa, M. Machado, D.N.A. Flores-Borges, J.F. Sales, D.C. de Oliveira, J.L.S. Mayer, V.C. Kuster, D.I. Rocha, Albinism in plants - far beyond the loss of chlorophyll: Structural and physiological aspects of wild-type and albino royal poinciana (*Delonix regia*) seedlings, *Plant Biol (Stuttg)*, (2020).
- [7] V. Patil, M. Patil, S. Narkhede, Albino Wildling of *Tabernaemontana alternifolia* L. and a Review of Albinism in Forest Plants in India, *Journal of Tree Sciences*, 34 (2015) 1-10.
- [8] T. Hu, K.J. Kasha, A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris, *Genome*, 42 (1999) 432-441.
- [9] R. Sharma, V.B. Patel, H. Krishna, Relationship between light, fruit and leaf mineral content with albinism incidence in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), *Scientia Horticulturae - SCI HORT-AMSTERDAM*, 109 (2006) 66-70.
- [10] M. Kumari, H.J. Clarke, I. Small, K.H.M. Siddique, Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28 (2009) 393-409.
- [11] J. Pittermann, J. Cowan, N. Kaufman, A. Baer, E. Zhang, D. Kutty, The water relations and xylem attributes of albino redwood shoots (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.), *PLoS One*, 13 (2018) e0191836.
- [12] X. Meng, J. Xu, M. Zhang, R. Du, W. Zhao, Q. Zeng, Z. Tu, J. Chen, B. Chen, Third-generation sequencing and metabolome analysis reveal candidate genes and metabolites with altered levels in albino jackfruit seedlings, *BMC Genomics*, 22 (2021) 543.
- [13] M. Andriankaja, S. Dhondt, S. De Bodt, H. Vanhaeren, F. Coppens, L. De Milde, P. Mühlenbock, A. Skirycz, N. Gonzalez, Gerrit T.S. Beemster, D. Inzé, Exit from Proliferation during Leaf Development in *Arabidopsis thaliana*: A Not-So-Gradual Process, *Developmental Cell*, 22 (2012) 64-78.
- [14] S.E. Marcus, Y. Verhertbruggen, C. Hervé, J.J. Ordaz-Ortiz, V. Farkas, H.L. Pedersen, W.G.T. Willats, J.P. Knox, Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls, *BMC Plant Biology*, 8 (2008) 60.
- [15] J.J. Ordaz-Ortiz, S.E. Marcus, J. Paul Knox, Cell Wall Microstructure Analysis Implicates Hemicellulose Polysaccharides in Cell Adhesion in Tomato Fruit Pericarp Parenchyma, *Molecular Plant*, 2 (2009) 910-921.
- [16] A. Thonglim, S. Delzon, M. Larter, O. Karami, A. Rahimi, R. Offringa, J.J. Keurentjes, S. Balazadeh, E. Smets, F.J.A.o.b. Lens, Intervessel pit membrane thickness best explains

variation in embolism resistance amongst stems of *Arabidopsis thaliana* accessions, 128 (2021) 171-182.

[17] L. Pereira, A.P. Domingues-Junior, S. Jansen, B. Choat, P. Mazzafera, Is embolism resistance in plant xylem associated with quantity and characteristics of lignin?, *Trees*, 32 (2018) 349-358.

[18] J.J.G. Pittermann, The evolution of water transport in plants: an integrated approach, 8 (2010) 112-139.

[19] O. Lerouxel, D.M. Cavalier, A.H. Liepman, K. Keegstra, Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process, *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (2006) 621-630.

[20] R.A. Burton, M.J. Gidley, G.B. Fincher, Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls, *Nature Chemical Biology*, 6 (2010) 724-732.

[21] C.T. Teixeira, D.C.d. Oliveira, V.C. Kuster, R.M.d.S. Isaias, Immunocytochemical demonstration of cell wall components related to tissue compartments in the globoid galls induced by *Clinodiplosis* sp. (Cecidomyiidae) on *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae), 96 (2018) 9-18.

[22] C. Cai, C. Xu, X. Li, I. Ferguson, K. Chen, Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignification enzymes in loquat fruit flesh after harvest, *Postharvest Biology and Technology*, 40 (2006) 163-169.

[23] M.M.J.A.b. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, 72 (1976) 248-254.

[24] R. Porra, W. Thompson, P.J.B.e.B.A.-B. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, 975 (1989) 384-394.

[25] A.R. Fernie, A. Roscher, R.G. Ratcliffe, N.J.J.P. Kruger, Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells, 212 (2001) 250-263.

[26] P.L.J.A.c. Kirk, Kjeldahl method for total nitrogen, 22 (1950) 354-358.

[27] J.J.T.J.o.A.S. Bremner, Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method, 55 (1960) 11-33.

[28] D. Cataldo, M. Maroon, L.E. Schrader, V.L.J.C.i.s.s. Youngs, p. analysis, Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid, 6 (1975) 71-80.

[29] B.J.C.i.S.S. Wolf, P. Analysis, Improvements in the azomethine-H method for the determination of boron, 5 (1974) 39-44.

[30] J. Braga, B.J.R.C. Defelipo, Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas, 21 (1974) 73-85.

[31] R. Blanchar, G. Rehm, A.J.S.S.S.o.A.J. Caldwell, Sulfur in plant materials by digestion with nitric and perchloric acid, 29 (1965) 71-72.

[32] C.N. Giannopolitis, S.K.J.P.p. Ries, Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings, 59 (1977) 315-318.

[33] C. Beauchamp, I.J.A.b. Fridovich, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, 44 (1971) 276-287.

[34] I. Cakmak, H.J.P.p. Marschner, Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves, 98 (1992) 1222-1227.

[35] M.D. Anderson, T.K. Prasad, C.R.J.P.p. Stewart, Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings, 109 (1995) 1247-1257.

- [36] Y. Nakano, K.J.P. Asada, c. physiology, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, 22 (1981) 867-880.
- [37] M. Kar, D.J.P.p. Mishra, Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence, 57 (1976) 315-319.
- [38] L.J.J.A.m. Guo, Nanoimprint lithography: methods and material requirements, 19 (2007) 495-513.
- [39] M.J.P.p. Zucker, Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue, 40 (1965) 779.
- [40] N. Zieslin, R.J.P.P. Ben Zaken, Biochemistry, Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers, (1993).
- [41] M. Barber, J.J.P. Ride, M.P. Pathology, A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response, 32 (1988) 185-197.
- [42] R.L. Heath, L.J.A.o.b. Packer, biophysics, Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, 125 (1968) 189-198.
- [43] R.C. GRAHAM JR, U. LUNDHOLM, M.J.J.J.o.H. KARNOVSKY, Cytochemistry, Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole, 13 (1965) 150-152.
- [44] T. O'Brien, N. Feder, M.E.J.P. McCully, Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O, 59 (1964) 368-373.
- [45] D.A. Johansen, Plant microtechnique, McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p, 1940.
- [46] T.P. O'Brien, M.E. McCully, The study of plant structure principles and selected methods, in, 1981.
- [47] G. Vidal, P. Galmard, P.J.A.C. Lanusse, Quantitative determination of nitrogen in iron by spark source mass spectrometry, 42 (1970) 98-100.
- [48] M.J.T.h.M.e.C. Gabe, Paris, Détection histochimique des polysaccharides, (1968) 428430.
- [49] W.G. Willats, G. Limberg, H.C. Buchholt, G.-J. van Alebeek, J. Benen, T.M. Christensen, J. Visser, A. Voragen, J.D. Mikkelsen, J.P.J.C.R. Knox, Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation, 327 (2000) 309-320.
- [50] M.H. Clausen, W.G. Willats, J.P. Knox, Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7, Carbohydr Res, 338 (2003) 1797-1800.
- [51] L. Jones, G. Seymour, P. Knox, Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1->4)-[beta]-D-Galactan, Plant physiology, 113 (1997) 1405-1412.
- [52] W.G. Willats, S.E. Marcus, J.P.J.C.r. Knox, Generation of a monoclonal antibody specific to (1->5)-alpha-l-arabinan, 308 (1998) 149-152.
- [53] Y. Verhertbruggen, S.E. Marcus, A. Haeger, J.J. Ordaz-Ortiz, J.P.J.C.r. Knox, An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan, 344 (2009) 1858-1862.
- [54] M. Smallwood, E.A. Yates, W.G. Willats, H. Martin, J.P.J.P. Knox, Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot, 198 (1996) 452-459.
- [55] E.A. Yates, J.F. Valdor, S.M. Haslam, H.R. Morris, A. Dell, W. Mackie, J.P. Knox, Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies, Glycobiology, 6 (1996) 131-139.
- [56] L. McCartney, S.E. Marcus, J.P. Knox, Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans, The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 53 (2005) 543-546.

- [57] C. Ruprecht, M.P. Bartetzko, D. Senf, P. Dallabernadina, I. Boos, M.C.F. Andersen, T. Kotake, J.P. Knox, M.G. Hahn, M.H. Clausen, F. Pfrenge, A Synthetic Glycan Microarray Enables Epitope Mapping of Plant Cell Wall Glycan-Directed Antibodies, *Plant Physiol*, 175 (2017) 1094-1104.
- [58] S.E. Marcus, A.W. Blake, T.A. Benians, K.J. Lee, C. Poyser, L. Donaldson, O. Leroux, A. Rogowski, H.L. Petersen, A. Boraston, H.J. Gilbert, W.G. Willats, J.P. Knox, Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls, *Plant J*, 64 (2010) 191-203.
- [59] L. Taiz, E. Zeiger, *Fisiologia vegetal*, Universitat Jaume I, 2006.
- [60] C. Bredemeier, C.M. Mundstock, Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas, *Ciência Rural*, 30 (2000) 365-372.
- [61] A. Maillard, S. Diquélou, V. Billard, P. Laîné, M. Garnica, M. Prudent, J.-M. Garcia-Mina, J.-C. Yvin, A. Ourry, Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency, 6 (2015).
- [62] R. Kathalia, S.C. Bhatla, *Plant Mineral Nutrition*, in: S.C. Bhatla, M. A. Lal (Eds.) *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Springer Singapore, Singapore, 2018, pp. 37-81.
- [63] D.J. Cosgrove, *Plant Cell Growth and Elongation*, in: eLS, 2014.
- [64] P.S. Robert, C.L. Edward, Immunocytological Analysis of Potato Tuber Periderm and Changes in Pectin and Extensin Epitopes Associated with Periderm Maturation, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130 (2005) 936-942.
- [65] A.F. de Melo Silva, L.G. Lana, V.C. Kuster, D.C. de Oliveira, Chemical composition of cell wall changes during developmental stages of galls on *Matayba guianensis* (Sapindaceae): perspectives obtained by immunocytochemistry analysis, *The Science of Nature*, 108 (2021) 16.
- [66] K.R. Silva, V.C. Kuster, A.F. de Melo Silva, D. Coelho de Oliveira, Remodelling of cell wall composition during leaf development in *Lavoisiera mucorifera* (Melastomataceae) %J *Australian Journal of Botany*, 67 (2019) 140-148.
- [67] Y.B. Park, D.J. Cosgrove, Changes in Cell Wall Biomechanical Properties in the Xyloglucan-Deficient xxt1/xxt2 Mutant of *Arabidopsis* *Plant Physiology*, 158 (2011) 465-475.
- [68] C.R.d.S. Curvêlo, F.Á. Rodrigues, L.d.C. Silva, K.J.T. Nascimento, P.G.J.B. Berger, Biochemical aspects of cotton resistance to ramularia leaf spot mediated by silicon, 72 (2013) 41-51.
- [69] K.J.T. Nascimento, D. Debona, S.K.S. França, M.G.M. Gonçalves, F.M. DaMatta, F.Á.J.P. Rodrigues, Soybean resistance to *Cercospora sojina* infection is reduced by silicon, 104 (2014) 1183-1191.
- [70] N.D. Kruse, R.A. Vidal, C. Dalmaz, M. Trezzi, I.J.P.D. Siqueira, Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone, 24 (2006) 379-390.
- [71] A. Crivellaro, U. Büntgen, New Evidence of Thermally Constrained Plant Cell Wall Lignification, *Trends in Plant Science*, 25 (2020) 322-324.