

ADRIANA BROMBINI DOS SANTOS

**“ESTUDO DA DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB CONDIÇÃO
DE DÉFICIT HÍDRICO E BAIXA TEMPERATURA”**

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ADRIANA BROMBINI DOS SANTOS

**“ESTUDO DA DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM GENÓTIPOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR SOB CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO E
BAIXA TEMPERATURA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Adriana Brombini dos Santos

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de
Doutora em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

**CAMPINAS,
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sa59e Santos, Adriana Brombini dos, 1979-
Estudo da deposição de lignina em genótipos de cana-de-açúcar sob
condição de déficit hídrico e baixa temperatura / Adriana Brombini dos Santos. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Paulo Mazzafera.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Lignina. 2. Cana-de-açúcar. 3. Biomassa. 4. Desidratação. 5. Baixas
temperaturas. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of lignin deposition in sugarcane genotypes under condition of water deficit and low temperature

Palavras-chave em inglês:

Lignin

Sugarcane

Biomass

Dehydration

Low temperatures

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Paulo Mazzafera [Orientador]

Helaine Carrer

Eduardo Caruso Machado

Marcelo Menossi Teixeira

Rafael Vasconcelos Ribeiro

Data de defesa: 14-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 14 de maio de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Helaine Carrer


Assinatura

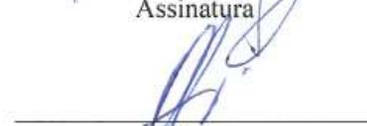
Dr. Eduardo Caruso Machado


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira


Assinatura

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro


Assinatura

Dr. Marcos Guimarães de Andrade Landell

Assinatura

Dr. Márcio José da Silva

Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer

Assinatura

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), uma gramínea C4, representa uma abundante e promissora fonte de biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis. O uso da biomassa para a conversão em etanol é limitado pela recalcitrância do material lignocelulósico, principalmente, devido à presença da lignina. O conteúdo e a composição da lignina variam entre diferentes táxons, tipos celulares e podem ser afetados por diversos fatores ambientais. Considerando a demanda mundial por fontes de energia renovável e o alto potencial da biomassa da cana-de-açúcar para a produção de etanol celulósico, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do déficit hídrico e da baixa temperatura sobre a deposição de lignina no colmo em diferentes genótipos de cana. Os resultados obtidos para o conteúdo de lignina somados à caracterização anatômica da lignina no caule indicaram que as plantas IACSP94-2094 são mais lignificadas que IACSP95-5000, sob condições normais de crescimento, o que foi principalmente associado aos maiores teores de lignina na região do córtex dos entrenós maduros. O déficit hídrico influenciou negativamente a produção de biomassa nas plantas de cana e o genótipo IACSP94-2094 foi mais fortemente afetado, o que poderia estar relacionado à severidade do estresse ou a maior suscetibilidade desse genótipo durante a fase de alongamento do caule. O déficit hídrico induziu alterações significativas nos níveis de expressão dos genes da biossíntese de lignina, aumentando em cerca de 60 % o conteúdo de lignina na medula jovem, o que foi positivamente relacionado ao acúmulo de transcritos dos genes *Sh4CL2* e *ShCOMT1* em ambos os genótipos. Paralelamente, este estudo caracterizou alguns aspectos da lignificação do caule em dois outros genótipos de cana-de-açúcar sob condição de baixa temperatura. Verificou-se que as plantas IACSP04-627 apresentaram maior produtividade média por planta (massa fresca do caule) que IACSP04-065 sob condição referência. O frio afetou negativamente o crescimento das plantas e, aparentemente, IACSP04-065 mostrou-se mais sensível às baixas temperaturas que o outro genótipo. O teor de lignina foi significativamente aumentado no córtex jovem do genótipo IACSP04-627 em resposta às baixas temperaturas, o que não pode ser diretamente correlacionado ao perfil de expressão dos genes da biossíntese de monolignóis. O conteúdo de lignina no córtex do entrenó maduro foi reduzido nas plantas IACSP04-065 expostas ao frio, o que poderia estar correlacionado ao baixo nível de expressão dos genes *ShCOMT1* e *ShCCoAOMT1*. A maior expressão de *ShF5H* ocorreu preferencialmente na medula madura em ambos os genótipos de cana, o que possivelmente estaria relacionado à formação precoce da parede celular secundária induzida pelo frio. Em conclusão, verificou-se que o déficit hídrico parece estar relacionado ao aumento do teor de lignina nos entrenós jovens da cana-de-açúcar em ambos os genótipos; já na condição de baixa temperatura, o nível de expressão gênica não mostrou relação nítida com as alterações nos teores de lignina no caule, que apresentaram um padrão de deposição genótipo-dependente.

Palavras-chave: lignina, cana-de-açúcar, déficit hídrico, baixa temperatura, bioetanol

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) a C4 grass, is an abundant and promising source of plant biomass for biofuel production. The use of biomass for conversion to ethanol is limited by the recalcitrance of lignocellulosic material mainly due to the presence of lignin. The content and composition of lignin varies between different taxa, cell types and can be affected by various environmental factors. Given the global demand for renewable energy sources and high potential of sugarcane biomass to produce cellulosic ethanol, the aim of this study was to evaluate the effects of drought and low temperature on the deposition of lignin in the stem in different sugarcane genotypes. The results obtained for lignin and the anatomical characterization of lignin in the stem indicated that IACSP94-2094 plants are more lignified than IACSP95-5000 under normal growth conditions, which was mainly associated with higher lignin contents in the rind region of mature internodes. Water deficit negatively affected the biomass production in sugarcane plants and IACSP94-2094 genotype was more strongly affected, what might be related with the severity of stress or increased susceptibility of this genotype during the stem elongation. Drought induced significant changes in expression levels of lignin biosynthesis genes, increasing by about 60% the lignin content in young pith which was positively related to the accumulation of transcripts of *ShACL2* and *ShCOMT1* genes in both genotypes. Simultaneously, this study characterized some aspects of lignification of the stem into two other genotypes of sugarcane under the condition of low temperatures. It was found that the IACSP04-627 plants showed higher average yield per plant (fresh weight of the stem) than IACSP04-065 under reference condition. The cold negatively affected plant growth and apparently IACSP04-065 was more sensitive to low temperatures than the other genotype. The lignin content was significantly increased in young rind of IACSP04-627 genotype in response to low temperature, which can not be directly correlated to the expression profile of monolignols biosynthesis genes. Lignin content in mature rind was reduced in IACSP04-065 plants exposed to cold, which could be correlated to the low level of expression of *ShCOMT1* and *ShCCoAOMT1* genes. The high expression of *ShF5H* occurred preferentially in mature pith of both sugarcane genotypes, which possibly is related to the early formation of the secondary cell wall was induced by cold. In conclusion, it was found that water deficit appears to be related to the lignin content increased in young internodes of sugarcane in both genotypes; in the condition of low temperature, the level of gene expression showed no clear correlation with changes in lignin content in the stem, which showed a pattern of deposition genotype-dependent.

Key words: lignin, sugarcane, water deficit, low temperature, bioethanol

SUMÁRIO

Dedicatória	xiii
Agradecimentos	xiv
Lista de abreviaturas e siglas	xvii
Introdução Geral	1
Referências	4
Objetivo Geral	6
Capítulo 1	7
Objetivos Específicos	8
1. Introdução	9
2. Material & Métodos	18
2.1. Material vegetal e condições de crescimento	18
2.2. Tratamento de estresse hídrico	18
2.3. Avaliações biométricas	20
2.4. Análises bioquímicas	20
2.5. Análises qualitativa e quantitativa da lignina	21
2.5.1. Análise morfo-anatômica	21
2.5.2. Determinação do conteúdo de lignina	22
2.6. Análise de expressão gênica	23
2.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	23
2.6.2. PCR quantitativa (<i>q</i> PCR)	24
2.7. Estatística	25
3. Resultados	27
3.1. Biometria	27
3.2. Sacarose, açúcares redutores e prolina livre	29
3.3. Análise qualitativa e quantitativa da lignina em cana	31
3.3.1. Caracterização morfo-anatômica	31
3.3.2. Ligninas solúveis	34
3.3.3. Quantificação de lignina	36
3.4. Análises de expressão gênica por <i>q</i> PCR	38

4.	Discussão	42
5.	Conclusões	55
6.	Referências	56
Capítulo 2		63
Objetivos Específicos		64
1.	Introdução	65
2.	Material & Métodos	72
2.1.	Material vegetal e desenho experimental	72
2.2.	Dados biométricos	74
2.3.	Determinação de sacarose, glicose e frutose	75
2.4.	Análises qualitativa e quantitativa da lignina	75
2.4.1.	Análise morfo-anatômica	75
2.4.2.	Determinação do conteúdo de lignina	76
2.5.	Análise de expressão gênica	77
2.5.1.	Extração de RNA e síntese de cDNA	77
2.5.2.	PCR quantitativa (<i>q</i> PCR)	78
2.6.	Estatística	78
3.	Resultados	79
3.1.	Dados biométricos	79
3.2.	Sacarose e açúcares redutores	81
3.3.	Análise qualitativa e quantitativa da lignina em cana	82
3.3.1.	Caracterização morfo-anatômica	82
3.3.2.	Perfil de ligninas solúveis	85
3.3.3.	Quantificação de lignina	88
3.4.	Análises de expressão gênica por <i>q</i> PCR	89
4.	Discussão	93
5.	Conclusão	105
6.	Referências	106
Anexo 1		113
Anexo 2		114

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria e Isaias, por confiarem nas minhas escolhas

Ao meu esposo, Caio, pelo amor, companheirismo e compreensão

E, especialmente, à minha filha, Giovanna, por tornar essa conquista mais valiosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir caminhar até aqui...

Aos meus pais, pelo exemplo e grande esforço dedicados à minha formação.

Aos meus avós, Bernadina e Júlio (*in memoriam*), pelos conselhos e por acreditarem em mim.

Ao meu esposo e à minha querida filha, pelo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente.

À amiga Letícia, por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação, amizade e grande paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

A FAPESP-BIOEN 2008/58035 pelo apoio financeiro

A Capes e ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa.

Aos parceiros do Centro de Cana do Instituto Agrônômico (IAC Ribeirão Preto) pela colaboração e orientação técnica sobre a cultura da cana-de-açúcar ao longo desse projeto.

A todos os funcionários do departamento, especialmente à profa. Dra. Alexandra C. H. F. Sawaya e ao Sr. Eduardo Kiyota pelas análises no espectrômetro de massas.

À Dra. Juliana L. S. Mayer pela colaboração nas análises anatômicas.

À Dra. Paula Macedo Nobile e ao Dr. Michael dos Santos Brito por toda a ajuda com as análises de expressão gênica.

A todos os colegas do departamento de Fisiologia Vegetal, em especial aos membros do LaFiMP, àqueles de longa data Xam, Pedro, Adilson, Luciano, Dudu, Juzinha e Sara, e também aos recém-chegados, mas não menos importantes, Flavinha, Ilse, Letícia e Vanessa. Obrigado por tornarem nosso laboratório um ótimo ambiente de trabalho e também de companheirismo e amizade.

A todos os estagiários do LaFiMP, especialmente Laerti, Kellen, Vivi, Bruno, Bruninha e Luana, que em diversos momentos participaram da realização deste trabalho.

Aos membros da pré-banca e banca pelas valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Enfim, agradeço a todas às pessoas que com pequenas ou grandes ações ajudaram na construção do meu trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C3H	<i>p</i> -coumarato 3-hidroxilase
C4H	cinamato 4-hidroxilase
CAD	cinamoil álcool desidrogenase
CCoAOMT	cafeoil-CoA <i>O</i> -metiltransferase
CCR	cinamoil-CoA redutase
COMT	ácido cafeico <i>O</i> -metiltransferase
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTAB	Brometo de Cetil-Metil-Amônia
4CL	4-Hidroxicinamoil CoA ligase
F5H	ferulato 5-hidroxilase
HCT	<i>p</i> -Hidroxicinamil-CoA chiquimato/ quinato hidroxicinamoil transferase
PAL	fenilalanina amônia-liase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
UPLC-MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas

INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma cultura amplamente plantada em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo e sua importância econômica é representada pela alta capacidade das plantas em estocar sacarose nos colmos, chegando a acumular até 60 % da massa seca do caule na forma desse açúcar (Casu *et al.*, 2004). O etanol é produzido a partir da fermentação da sacarose e do amido provenientes de diversas fontes vegetais como, por exemplo, a cana-de-açúcar, o milho e a beterraba. Em 2012, Brasil e USA produziram juntos cerca de 19 milhões de galões de etanol de primeira geração, mantendo-se como os maiores produtores mundiais de bioetanol, o que corresponde a aproximadamente 90 % da produção global (RFA, 2013).

A cana-de-açúcar permite uma grande eficiência na produção de etanol de primeira geração e, atualmente, representa também uma importante fonte de material lignocelulósico (bagaço, palha e ponteiro) com potencial para a conversão em biocombustíveis. Adicionalmente, a cana é uma cultura até então insuperável em termos de produção de matéria seca e energia/ha, podendo também ser empregada para fins forrageiros (Landell *et al.*, 2002). A produção anual de biomassa seca por unidade de área é significativamente maior na cana-de-açúcar (39 t/ha, bagaço, palhas e ponteiro) quando comparada a outras culturas de alto rendimento energético tais como *Miscanthus* (29,6 t/ha), milho (17,6 t/ha, grãos e palha) e ‘switchgrass’ (10,4 t/ha) (Heaton *et al.*, 2008).

A biomassa vegetal é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina em proporções que variam de acordo com a origem do material. O uso do material lignocelulósico envolve o pré-tratamento da biomassa visando à desestruturação das paredes celulares, a liberação de açúcares fermentáveis (sacarificação) e, finalmente, a fermentação desses açúcares para obtenção de bioetanol (Himmel *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008). A recalcitrância intrínseca da biomassa lignocelulósica constitui um dos maiores obstáculos à conversão dos

polissacarídeos da parede celular em açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis (Vanholme *et al.*, 2010; Cesarino *et al.*, 2012). Nesse contexto, a lignina representa o principal fator associado à recalcitrância da biomassa vegetal, limitando o seu aproveitamento para a produção do etanol de segunda geração.

A lignina é um heteropolímero aromático composto pelas unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) que compõem principalmente as paredes secundárias de tipos celulares especializados. O surgimento da lignina como um componente estrutural da parede celular proporcionou integridade às células vegetais, possibilitando a sustentação do corpo da planta e hidrofobicidade às células condutoras do xilema, permitindo um eficiente transporte de água, o que representou um passo evolutivo essencial para o sucesso das plantas no ambiente terrestre (Boerjan *et al.*, 2003). Durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica, a lignina funciona como uma barreira mecânica natural e impede o acesso das enzimas hidrolíticas às fibrilas de celulose e, adicionalmente, a lignina pode adsorver irreversivelmente às celulases e, em ambos os casos, a eficiência do processo ficaria prejudicada (Keating *et al.*, 2006).

As plantas não são capazes de sobreviver sem lignina. Contudo, resultados obtidos pela análise de plantas transgênicas modificadas na biossíntese de lignina têm mostrado que as plantas podem tolerar significativas variações no conteúdo e, principalmente, na composição do polímero, através da incorporação de monômeros incomuns como aldeídos hidroxicinamil, acetatos hidroxicinamil e ácidos hidroxicinâmicos (Ralph *et al.*, 2001; Boerjan *et al.*, 2003). Desse modo, a manipulação dos genes da via de biossíntese de monolignóis apresenta-se como uma estratégia interessante para reduzir a recalcitrância da biomassa e aumentar a produção de açúcares fermentáveis. De fato, Chen & Dixon (2007) demonstraram que entre seis linhagens transgênicas de alfalfa reguladas negativamente para diferentes genes da biossíntese de

lignina, os melhores resultados nas etapas de pré-tratamento e sacarificação enzimática foram observados nas linhagens com menor teor de lignina.

Estudo realizado por Masarin *et al.* (2011) indicou que o conteúdo de lignina no bagaço da cana varia entre diferentes genótipos e que, aparentemente, não há uma correlação linear entre a produção de biomassa (e/ou sacarose) e o teor de lignina. Apesar do conhecimento acerca da variabilidade genética da cana em relação ao teor de lignina, pouco é conhecido sobre como essa diversidade pode ser modulada sob diferentes condições ambientais e o como tais alterações poderiam afetar a composição e a qualidade da biomassa da cana-de-açúcar. Em um genoma altamente poliplóide e complexo como o da cana-de-açúcar, entender como diferentes fatores abióticos podem influenciar o metabolismo da lignina em termos de conteúdo e/ou composição poderia contribuir para a identificação de genes-chave que atuam no processo de regulação e/ou de deposição de lignina na parede celular, visando possíveis estratégias para a manipulação genética.

Dentro dessa proposta, nosso estudo investigou como a biossíntese de lignina pode ser modulada pelo déficit hídrico e pelas baixas temperaturas em genótipos de cana-de-açúcar, crescidos em casa de vegetação. Os dados sugerem um padrão de resposta relativamente complexo, que variou entre os genótipos e também entre as regiões do colmo analisadas. Assim, nem sempre foi possível estabelecer uma correlação direta entre o nível de expressão dos genes da biossíntese de monolignóis e as alterações observadas no conteúdo de lignina nas plantas submetidas às condições de déficit hídrico e baixas temperaturas. Embora mais estudos sejam necessários, nossos resultados mostraram os genes mais diretamente afetados pelos tratamentos e o quanto as alterações no nível de expressão desses genes poderiam modificar o conteúdo de lignina nas diferentes regiões do colmo da cana.

REFERÊNCIAS

- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *A Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 519-546
- Casu, R., Dimmock, C., Chapman, S., Grof, C., McIntyre, C., Bonnett, G. & Manners J., 2004. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Mol. Biol.*, 54: 503-517
- Cesarino, I., Araujo, P., Mayer, J.L.S., Leme, A.F.P. & Mazzafera, P., 2012. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. *Plant Physiol. Biochem.*, 55: 66-76
- Chen, F. & Dixon, R.A., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnol.*, 25: 759-761
- Heaton, E.A., Dohleman, F.G. & Long, S.P., 2008. Meeting US biofuel goals with less land: the potential of *Miscanthus*. *Global Change Biol.*, 14: 2000-2014
- Himmel, M.E., Ding, S-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. & Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315: 804-807
- Keating, J.D., Panganiban, C. & Mansfield, S.D., 2006. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 1196-1206
- Landell, M.G.A., Campana, M.P., Rodrigues, A.A., Cruz, G.M., Batista, L.A.R., Figueiredo, P., Silva, M.A., Bidóia, M.A.P., Rosseto, R., Matins, A.L.M., Gallo, P.B., Kanthack, R.A.D., Cavichioli, J.C., Vasconcelos, A.C.M. & Xavier, M.A., 2002. A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. Boletim Técnico IAC 193, Instituto Agrônomo, Campinas, 36p
- Masarin, F., Gurpilhares, D.B., Baffa, D.C.F., Barbosa, M.H.P., Carvalho, W., Ferraz, A. & Milagres, A.M.F., 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol. Biofuels*, 4: 55
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J.M., Kim, H., Lu, F.C., Hatfield, R.D., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M.R., Van Doorselaere, J., Sederoff, R.R., O'Malley, D.M., Scott, J.T., MacKay, J.J., Yahiaoui, N., Boudet, A.M., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L. &

- Boerjan W., 2001. Elucidation of new structures in lignins of *CAD*- and *COMT*-deficient plants by NMR. *Phytochemistry*, 57: 993-1003
- RFA - Renewable Fuels Association, 2013. Battling for the barrel – 2013 ethanol industry outlook. <http://www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook>
- Vanholme, R., Van Acker, R. & Boerjan, W., 2010. Potential of *Arabidopsis* systems biology to advance the biofuel field. *Trends Biotechnol.*, 28: 543-547
- Yuan, J.S., Tiller, K.H., Al-Ahmad, H., Stewart, N.R. & Stewart, C.N.Jr., 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends Plant Sci.*, 13: 421-429

OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do déficit hídrico e da baixa temperatura sobre a biossíntese de lignina no colmo em genótipos de cana-de-açúcar crescidos em casa de vegetação.

CAPÍTULO 1

DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM DOIS
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Analisar os efeitos do déficit hídrico sobre a deposição de lignina no caule de dois genótipos de cana-de-açúcar, IACSP94-2094 (tolerante à seca) e IACSP95-5000 (altamente produtivo), através da determinação do conteúdo de lignina em diferentes regiões do colmo (córtex jovem, medula jovem, córtex maduro e medula madura).

- 2 – Caracterizar o padrão de expressão dos genes da via de biossíntese de monolignóis, em diferentes regiões do colmo, de plantas de cana-de-açúcar submetidas a déficit hídrico severo.

- 3 – Identificar possíveis genes-alvo relacionados à regulação do conteúdo e/ou composição da lignina na cana com potencial para manipulação genética.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea C4 que constitui uma abundante e promissora fonte de biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis. A biomassa residual da cana (bagaço, palha e pontas) representa dois terços da energia total da planta, cujo potencial é parcialmente aproveitado com a queima do bagaço para gerar eletricidade nas usinas de álcool e açúcar (Marques, 2009). No Brasil, estima-se que na safra 2013/2014 sejam moídas 659,85 milhões de toneladas de cana, sendo cerca de 46,1 % destinados à produção de açúcar e 53,9 % à produção de etanol (CONAB, 2013). Estudos realizados no âmbito do Projeto Bioetanol, uma rede de pesquisa financiada pelo governo federal, avaliam que uma usina que produz hoje um milhão de litros/dia de etanol a partir do caldo da cana teria, inicialmente, capacidade de gerar um adicional de 150 mil litros de etanol do bagaço utilizando a tecnologia da hidrólise. A partir de 2025, o aperfeiçoamento da técnica, possibilitaria uma produção de 400 mil litros proveniente do bagaço recuperado (Marques, 2009).

O bagaço da cana é constituído por aproximadamente 50 % celulose, 25 % hemicelulose e 25 % lignina (Pandey *et al.*, 2000). É um material co-produzido na indústria sucroalcooleira e prontamente disponível para a produção de etanol celulósico. O aproveitamento da biomassa vegetal envolve o pré-tratamento desse material utilizando processos químicos e/ou biológicos para desestruturação do complexo lignocelulósico, e a lignina representa um dos principais componentes associados à recalcitrância da biomassa. A lignina funciona como uma barreira mecânica natural e impede o acesso das enzimas hidrolíticas às fibrilas de celulose. Adicionalmente, a lignina pode adsorver as enzimas usadas durante a hidrólise do material lignocelulósico, diminuindo a eficiência do processo e, além

disso, alguns produtos de degradação do polímero podem inibir etapas subsequentes da fermentação (Keating *et al.*, 2006).

A lignina é um complexo polímero fenólico derivado principalmente de três alcoóis hidroxicinamoil que variam no seu grau de metoxilação, os monolignóis *p*-coumaril, coniferil e sinapil. Após incorporação no polímero de lignina, via reações de acoplamento combinatorial, os monolignóis originam as subunidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004). A polimerização se dá pela adição de novos radicais monolignóis ao polímero em crescimento, usualmente via ligação na posição β tais como β -O-4, β -5 e β - β . A ligação β -O-4 (β aril-éter) é a mais frequente e também a mais facilmente clivada por processos químicos, enquanto as ligações denominadas condensadas (β -5, β - β , 5-5, 5-O-4 e β -1) são mais resistentes à degradação química (Boerjan *et al.*, 2003; Morreel *et al.*, 2004).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na biosfera, correspondendo a aproximadamente 30 % de todo o carbono orgânico. Além de contribuir para a integridade da parede celular, conferindo rigidez e suporte mecânico ao corpo da planta, a lignina é um polímero resistente à degradação, desempenhando assim um papel importante na proteção das plantas contra o ataque de patógenos (Boerjan *et al.*, 2003). O conteúdo e a composição da lignina variam entre diferentes táxons, tipos celulares e entre as camadas que compõem a parede celular e são modificados por fatores ambientais ao longo do desenvolvimento da planta (Campbell & Sederoff, 1996). Nas gimnospermas (*softwood*), a lignina é formada basicamente pela unidade G e traços de unidade H, enquanto angiospermas dicotiledôneas (*hardwood*) são compostas principalmente por unidades G e S, com baixos níveis de H. Nas gramíneas (monocotiledôneas), as unidades G e S são incorporadas em níveis similares e a quantidade de unidade H é relativamente maior quando comparado às dicotiledôneas (Boerjan

et al., 2003; Vanholme *et al.*, 2010). Adicionalmente, outros monômeros menos abundantes podem ser incorporados em níveis variáveis ao polímero de lignina (Ralph *et al.*, 2004; Morreel *et al.*, 2010).

Estudos realizados em gramíneas têm revelado que a incorporação das unidades H, G e S no polímero de lignina é regulada espaço-temporalmente, variando entre as paredes celulares primária e secundária e também entre tecidos distintos. Inicialmente, álcool coniferil e discretas quantidades de álcool *p*-coumaril são co-polimerizadas na parede primária formando um polímero de unidades G e H. Durante a formação da parede secundária, álcool coniferil e crescentes quantidades de álcool sinapil são incorporados, formando ligninas compostas por unidades G e S (He & Terashima, 1990; He & Terashima, 1991). A topologia e a composição da lignina em diferentes entrenós da cana-de-açúcar variam entre os principais tipos celulares presentes no caule: as fibras incorporam significativas quantidades de álcool sinapil e formam ligninas com a proporção S>G>H; nos vasos do xilema, unidades G e H são predominantes no protoxilema, enquanto o metaxilema apresentou composição semelhante às fibras; as células do parênquima possuem grande quantidade de ácidos fenólicos, não sendo possível determinar a proporção exata de cada unidade da lignina (He & Terashima, 1990). Similarmente a outras gramíneas, a cana possui elevadas quantidades de ácidos hidroxicinâmicos associados à parede celular e seus níveis são mais elevados no tecido parenquimático do que nos feixes vasculares. Os ácidos sinapil, ferúlico e *p*-coumárico são preferencialmente depositados nos estágios iniciais da lignificação e suas proporções relativas são alteradas com a maturidade dos tecidos (He & Terashima, 1990).

Na cana-de-açúcar, a anatomia dos entrenós mostra que eles são constituídos basicamente por células parenquimáticas e feixes vasculares e apresentam duas regiões morfológicamente distintas, o córtex (*rind*) e a medula (*pith*). O córtex é uma região que

contém predominantemente feixes vasculares, constituídos por vasos circundados por um grande número de fibras. A medula é formada por células de parênquima (células que armazenam a sacarose) onde se distribuem os feixes vasculares, em número inferior que no córtex (Moore, 1987).

Recentemente, pesquisadores utilizaram uma ampla abordagem envolvendo aspectos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares para realizar um estudo sistemático da deposição de lignina durante o desenvolvimento do caule da cana-de-açúcar (Bottcher *et al.*, 2013). Os autores produziram um perfil detalhado da lignina e compostos fenólicos relacionados à formação da parede celular em dois genótipos contrastantes para o teor de lignina, evidenciando diferenças quanto ao conteúdo e composição do polímero, razão S/G e expressão de genes da biossíntese de lignina entre o córtex e a medula (tecido parenquimático) do entrenó da cana.

Estudo conduzido por Siqueira *et al.* (2011) demonstrou a correlação entre a distribuição topoquímica da lignina e ácidos hidroxicinâmicos e a eficiência da hidrólise enzimática dos açúcares liberados da biomassa proveniente do bagaço da cana-de-açúcar. Amostras de medula foram prontamente hidrolisadas por celulasas e após 72 h de hidrólise atingiram 63 % de conversão de celulose, enquanto que as amostras do córtex alcançaram apenas 20 % de conversão. Por outro lado, o tratamento do córtex com solução de ácido acético/clorito, que promove a remoção da lignina e ácidos hidroxicinâmicos, resultou em significativo aumento da conversão de celulose, cerca de 60 % após 4 h de hidrólise. Em conjunto, esses dados confirmaram que o córtex do entrenó da cana é mais recalcitrante que a medula e, que provavelmente a alta resistência à desestruturação das paredes celulares está associada à maior lignificação do córtex devido à abundância de vasos do xilema e fibras.

Do ponto de vista industrial, a lignina tem impactos negativos sobre a polpação da madeira, a digestibilidade de forrageiras e também sobre a produção de biocombustíveis. A relação entre o conteúdo e/ou composição da lignina e a eficiência do uso do material lignocelulósico durante a sacarificação química/enzimática para a produção de bioetanol foi investigada em linhagens de alfafa transgênicas silenciadas para diferentes genes da via de biossíntese de lignina (Chen & Dixon, 2007). Os autores constataram que a eficiência de sacarificação para ramos de alfafa diretamente submetidos à hidrólise enzimática foi negativamente afetada pelo conteúdo e composição da lignina, enquanto para ramos quimicamente pré-tratados e a seguir levados à hidrólise, apenas o conteúdo da lignina pareceu influenciar a conversão da celulose em açúcares fermentáveis. Similarmente, Fu *et al.* (2011) mostraram que a manipulação genética da lignina em plantas de switchgrass (*Panicum virgatum* L.) via silenciamento de *COMT* reduziu moderadamente o conteúdo de lignina, diminuiu a razão S/G e aumentou a produção de etanol em até 38 %. Além disso, foi observado que as plantas requereram um pré-tratamento menos severo e menores quantidades de celulase, evidenciando a redução da recalcitrância da biomassa nas plantas transgênicas.

Com efeito, o estudo de mutantes e plantas transgênicas com expressão alterada dos genes da via de biossíntese de lignina em diversas espécies de plantas tem contribuído para melhorar nossa compreensão sobre o processo de formação da parede celular e os mecanismos moleculares que regulam a lignificação (Dixon *et al.*, 2001; Boerjan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008). Nesse sentido, a supressão de genes que atuam nos passos iniciais da via de biossíntese de lignina tais como *PAL*, *C4H*, *HCT* e *C3H* são, em geral, mais efetivos para a redução do conteúdo de lignina (fig. 1). Contrariamente, a redução do acúmulo dos transcritos de *F5H* ou *COMT*, genes relacionados à síntese da unidade S, tende a diminuir a razão S/G, com pouco ou nenhum efeito sobre o teor da lignina nas plantas (Li *et al.*, 2008). Utilizando a abordagem

de supressão por RNA de interferência (RNAi) foi mostrado que plantas de cana-de-açúcar com expressão reduzida de *COMT* apresentaram menores teores de lignina (3,9 % a 13,7 %) e redução da razão S/G e, paralelamente, aumentaram o rendimento de açúcares fermentáveis (29 % a 34 %) derivado da biomassa lignocelulósica (Jung *et al.*, 2012).

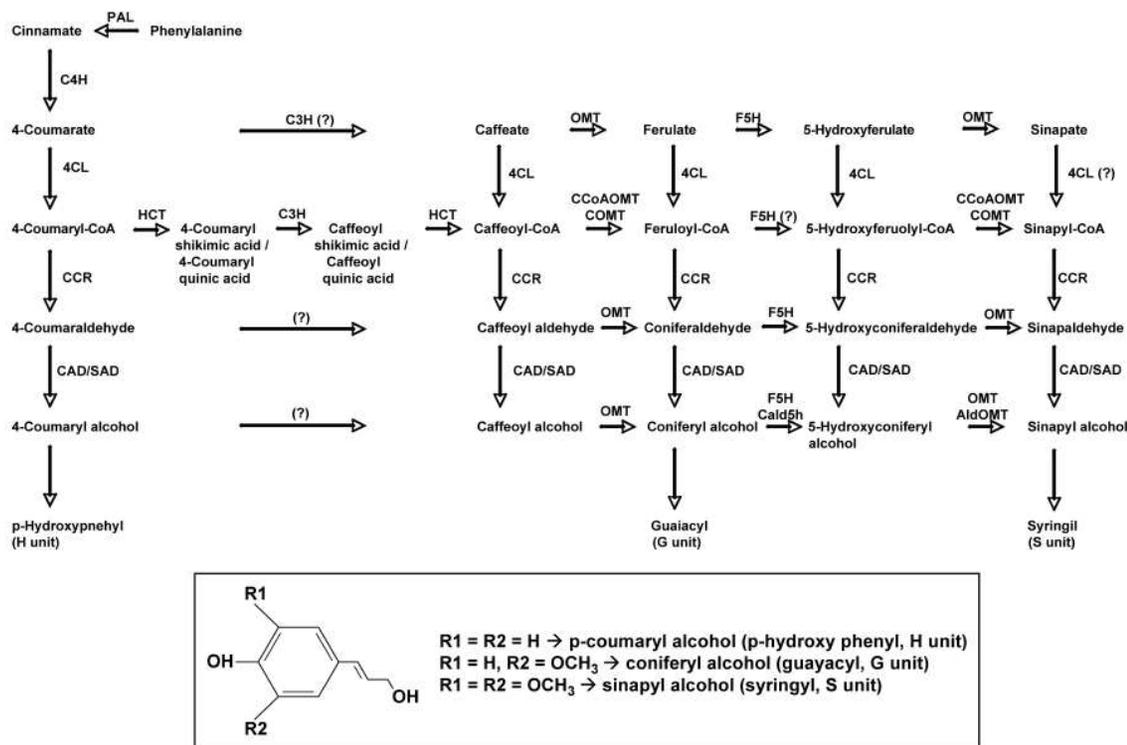


Figura 1. Rota de biossíntese de lignina em plantas. 4CL, 4-coumarate: coenzyme A ligase; AldOMT, 5-hydroxy coniferaldehyde *O*-methyltransferase; C3H, cinnamate 3-hydroxylase or p-coumaroyl shikimic acid/quinic acid 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; Cald5H, coniferaldehyde 5-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase; CCR, cinnamoyl coenzyme A reductase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; HCT, p-hydroxy cinnamoyl-CoA: shikimate/quinic acid p-hydroxy cinnamoyl transferase; OMT, *O*-methyltransferase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; SAD, sinapyl alcohol dehydrogenase (Moura *et al.*, 2010).

A despeito dos significativos avanços na manipulação genética da lignina com foco no aproveitamento do material lignocelulósico para fins diversos, é preciso ressaltar que reduções nos teores de lignina frequentemente são acompanhadas por perturbações no crescimento e desenvolvimento da planta. Embora as alterações fenotípicas observadas em plantas lignina-deficientes possam estar relacionadas ao colapso dos vasos do xilema devido à tensão gerada durante a transpiração, até o presente momento não está claro se o fenótipo de crescimento anormal é causado pela redução no conteúdo da lignina *per se* (Li *et al.*, 2008; Bonawitz & Chapple, 2013). Por exemplo, a significativa redução do crescimento observado em plantas de *Arabidopsis HCT*-deficientes foi associada ao acúmulo de flavonóides e não à alteração da síntese de lignina (Besseau *et al.*, 2007). Os autores comprovaram que a repressão da lignificação nas plantas *HCT*-deficientes redirecionou o fluxo metabólico para flavonóides via chalcona sintase, levando à redução do transporte de auxina e a um fenótipo de crescimento anormal.

Alterações na síntese de lignina podem ser induzidas por diversos estresses ambientais incluindo seca, baixas temperaturas, radiação UV-B, deficiência mineral e infecções por patógenos (Moura *et al.*, 2010). Estudos realizados em milho evidenciaram que a deposição de lignina é regulada espacialmente em diferentes órgãos da planta sob condição de déficit hídrico, demonstrando que a redução das taxas de crescimento está diretamente relacionada ao aumento dos níveis de expressão de genes da via de biossíntese de lignina e ao maior acúmulo de lignina nesses órgãos (Vincent *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006). Estudo realizado em raízes de milho mostrou que o estresse hídrico induzido por PEG 6000 levou a alterações no tamanho final das células e à progressiva redução do crescimento na região basal da zona de alongação das raízes (Fan *et al.*, 2006). Concomitantemente, os autores verificaram o aumento da expressão de *CCR1* e *CCR2* na zona de alongação da raiz e após 48 h de indução também

foram constatados maiores níveis de lignina nessa região. Trabalho realizado por Vincent *et al.* (2006) reportou que folhas jovens de milho em expansão acumulam a enzima COMT na região basal aproximadamente entre 10-20 cm do ponto de inserção da folha; entretanto, sob restrição hídrica, a região de maior acúmulo de COMT foi deslocada em direção à base da folha entre 2-10 cm. Adicionalmente, os autores constataram que as plantas sujeitas ao déficit hídrico exibiram menor conteúdo de lignina nessa região da folha em relação às plantas controle, o que de acordo com os autores, indicaria uma resposta adaptativa à seca, uma vez que a intensa lignificação da zona de alongação poderia comprometer a retomada do crescimento foliar após a reidratação (Vincent *et al.*, 2006).

Paralelamente, alguns estudos têm revelado que a expressão de genes e a presença de enzimas relacionadas à lignina e sua deposição nas paredes celulares pode ser diferencialmente regulada durante o estresse hídrico. Análises cDNA-AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e northern blot mostraram que a atividade de genes com função no crescimento celular e extensibilidade da parede em raízes de arroz foram potencializadas nos estágios iniciais do estresse, enquanto a expressão de genes relacionados à biossíntese de lignina foi consideravelmente elevada durante os estágios intermediário e final do déficit hídrico (Yang *et al.*, 2006). Estudo proteômico das raízes de *Citrullus lanatus* submetidas ao déficit hídrico comprovou que proteínas relacionadas à síntese de lignina como CCoAOMT e várias peroxidases classe III (envolvidas na lignificação) foram induzidas principalmente nos estágios finais do estresse (Yoshimura *et al.*, 2008).

Baseado em informações prévias produzidas por um estudo sistemático da deposição de lignina em cana-de-açúcar desenvolvido em nosso laboratório (Bottcher *et al.*, 2013), o presente trabalho investigou os efeitos do déficit hídrico sobre o metabolismo de lignina no caule de dois genótipos de cana-de-açúcar. As análises foram realizadas separadamente no

córtex e na medula de entrenós imaturos e maduros e buscaram determinar o perfil de expressão de um *set* de 12 genes relacionados à biossíntese de lignina após as plantas terem sido submetidas ao déficit hídrico. Nossos resultados indicam que o déficit hídrico severo e/ou prolongado pode afetar negativamente a qualidade da biomassa lignocelulósica da cana para a produção de bioetanol, devido à maior lignificação dos entrenós mais jovens do caule durante o estresse.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. *Material vegetal e condições de crescimento*

Dois genótipos comerciais de *Saccharum* spp. – IACSP94-2094, considerado tolerante à seca (Machado *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2013) e IACSP95-5000, altamente produtivo – foram obtidos junto ao Centro de Cana, Instituto Agrônômico, IAC Ribeirão Preto, Brasil. Cerca de um mês após o plantio dos toletes em bandejas com vermiculita, 15 plantas de cada genótipo foram transferidas para vasos de 20 L (uma planta por vaso) contendo substrato orgânico comercial e mantidas em casa de vegetação do Instituto de Biologia da Unicamp, Campinas, Brasil. Periodicamente, foi feita a retirada das brotações secundárias (perfilhos), de modo a preservar apenas o colmo principal no vaso. As plantas foram mantidas sob irrigação plena, com cada vaso sendo manualmente irrigado, durante todos os dias até o início dos tratamentos.

2.2. *Tratamento de estresse hídrico*

Plantas de cana-de-açúcar com cinco meses de idade mantidas em casa de vegetação foram submetidas a três regimes hídricos, 40 % (seca severa, SD), 80 % (seca moderada, MD) e 100 % (controle irrigado, C) da capacidade de armazenamento de água do substrato (C_a). O valor de C_a foi estimado com base na massa fresca do substrato após saturação (C_{mf}) e na massa seca (C_{ms}), obtida após secagem do substrato em estufa por 24 h a 105°C, de acordo com a equação $C_a = (C_{mf} - C_{ms}) \cdot 100 / C_{mf}$. O valor de C_a determinado para o substrato (41,8 % $\pm 1,1$) foi usado como referência para estimar o conteúdo de água nos vasos experimentais. Os tratamentos foram iniciados com a suspensão completa da irrigação. A partir de então, as perdas de água foram monitoradas diariamente obtendo-se o peso dos vasos até que atingissem os conteúdos de água esperados. Estabelecido os tratamentos de restrição hídrica (40 % ou 80

% de C_a), os vasos experimentais passaram a receber reposições de água em dias alternados, cujos volumes eram estimados a partir da pesagem de três vasos/tratamento/genótipo, que representavam a perda de água no intervalo de dois dias (fig. 2). O tratamento foi aplicado em cinco plantas/genótipo/tratamento, durante um período de 60 d para as plantas sujeitas a seca moderada e de 52 d para as plantas submetidas à seca severa (SD). As temperaturas médias máxima e mínima do ar na casa de vegetação foram de $28,4 \pm 3,8^\circ\text{C}$ e $11,8 \pm 2,6^\circ\text{C}$ respectivamente, e não houve controle da umidade relativa.

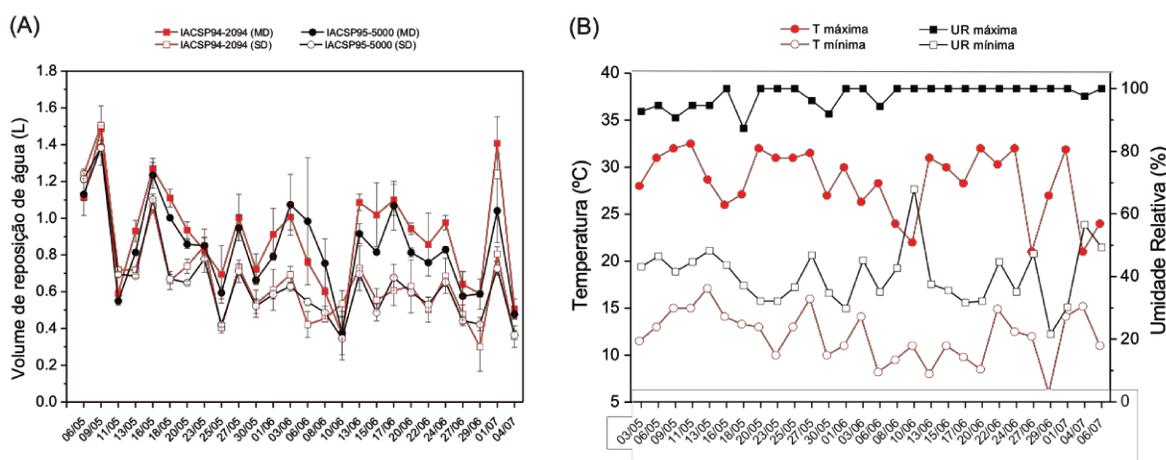


Figura 2. (A) Volume de água reposta nas plantas submetidas a restrição hídrica nos tratamentos 80 % (seca moderada, MD) e 40 % (seca severa, SD), estimado pela pesagem dos vasos experimentais nos genótipos de cana-de-açúcar IACSP942094 e IACSP95-5000. Cada valor representa a média \pm erro padrão de três plantas ($n=3$). (B) Valores máximos e mínimos da temperatura do ar e da umidade relativa durante o experimento.

Na coleta o caule foi numerado do ápice em direção à base, de forma que o entrenó 1 (E1) foi correspondente ao entrenó ao qual se inseria a folha +1. Duas fases distintas de maturação dos entrenós foram selecionadas: região jovem ou imatura (*young*)= *pool* E1-E3 e região madura (*mature*)= E8 ou E9. Cada uma dessas amostras foi separada em córtex (*rind*) e medula (*pith*) (fig. 3). Imediatamente após a coleta o material foi mantido em nitrogênio líquido e, posteriormente, ele foi dividido em duas partes: o material utilizado nas análises

bioquímicas foi liofilizado a -60°C por 72 h e o material usado nas análises moleculares armazenado a -80°C até o processamento.

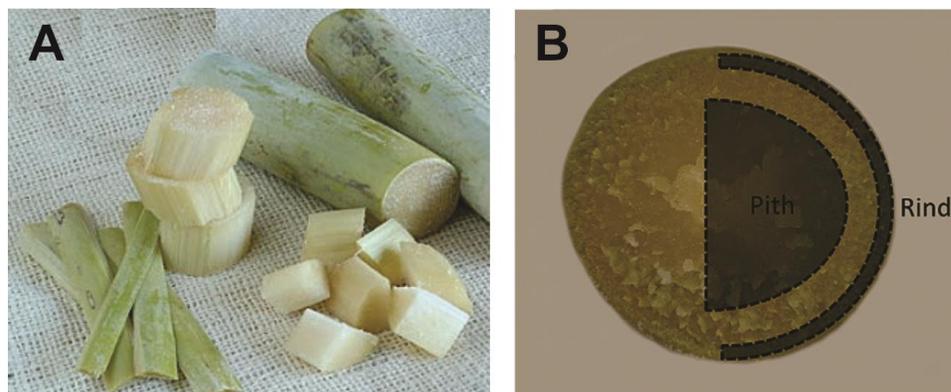


Figura 3. Coleta e processamento das diferentes regiões do entrenó da cana-de-açúcar (A). Divisão do entrenó em região do córtex (*rind*) e região da medula (*pith*) (B). Adaptado de Cesarino *et al.* (2012).

2.3. Avaliações biométricas

Ao término do ensaio, foram tomadas algumas medidas de crescimento das plantas tais como o número de folhas verdes (N_f), número de entrenós do caule (N_e), comprimento do caule (C_c), massa fresca do caule (MF_c), massa seca das folhas (MS_f) e massa seca das raízes (MS_r). Para contagem de N_f foram consideradas as folhas com $>50\%$ da lâmina foliar com coloração verde. O diâmetro dos entrenós do caule foi medido com paquímetro digital. Medidas da massa seca foram determinadas após secagem do material em estufa a 72°C por 72 h.

2.4. Análises bioquímicas

Extração: cerca de 50 mg de material liofilizado (medula) e pulverizado foi extraído com 1 mL de 80 % etanol em banho úmido a 40°C por 30 min (etapa repetida 2x). Em cada etapa, o material foi homogeneizado em vórtex por 30 s e o extrato foi centrifugado a 8000 g por 15

min. Uma fração de 750 µL do sobrenadante foi recuperada em cada etapa da extração. As duas frações foram reunidas e secas em concentrador SpeedVac (Savant). O resíduo foi dissolvido em 1 mL de água milli-Q. Este extrato foi utilizado na determinação dos teores de açúcares solúveis e de prolina

Dosagem do teor de açúcares solúveis: 50 µL do extrato foram homogeneizados em 950 µL de 80 % acetonitrila em água e uma alíquota de 4µL foi injetada em um espectrômetro de massas Acquity UPLC-MS (Micromass-Waters) acoplado a um TDQ triplo-quadrupolo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC C18-BEH (2,1 mm x 50 mm, 1,7µm) sob um fluxo de 0,2 mL/min. Os compostos foram eluídos utilizando um gradiente de 20 % a 35 % de uma solução 0,1 % NH₄OH em água (solvente B) e acetonitrila contendo 0,1 % NH₄OH (solvente A). As análises no espectrômetro de massas foram realizadas usando ionização por *electrospray* em modo negativo sob as seguintes condições: capilar 3,0 kV e cone 30 V, temperatura na fonte de ionização de 150°C e temperatura de dessolvatação de 350°C. O teor dos açúcares foi estimado a partir de curvas de calibração geradas por padrões comerciais de glicose, frutose e sacarose (5 a 100 µg/mL).

Dosagem do teor de prolina: o teor de prolina livre foi determinado segundo (Bates *et al.*, 1973). A absorbância foi lida em 520 nm e a concentração desse aminoácido nas amostras foi estimada com base em uma curva padrão de prolina (0,6 – 6,0 nmol/mL).

2.5. Análises qualitativa e quantitativa da lignina

2.5.1. Análise morfo-anatômica

Secções transversais da região mediana do terceiro (E3) e do nono (E9) entrenós do caule de plantas bem irrigadas foram manualmente obtidas. As secções foram dispostas em

lâminas de vidro e submetidas a reação com floroglucinol (Johansen, 1940). O material foi tratado por 5 min com uma solução 1 % floroglucinol em 95 % etanol e montadas em 25 % HCl. A visualização do material foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX51) e a captura das imagens foi feita com uma câmera (Olympus DP71) acoplada ao equipamento.

2.5.2. Determinação do conteúdo de lignina

Extração: aproximadamente 100 mg de material liofilizado e pulverizado foi homogeneizado com 1 mL de 80 % etanol e extraído em banho de ultrassom por 30 min. Após centrifugação, o precipitado sólido foi reservado, enquanto o sobrenadante foi coletado e evaporado em concentrador SpeedVac (Savant). O resíduo seco foi utilizado na análise de ligninas solúveis. A fração sólida do material foi lavada por mais três vezes com 80 % etanol para a completa retirada dos extrativos. A seguir, o material foi lavado com 1,5 mL de água Milli-Q, a fração aquosa foi descartada e o resíduo álcool insolúvel (alcohol-insoluble residue, AIR) foi conduzido para secagem (65°C por 24 h) e, posteriormente, utilizado na quantificação de ligninas com ácido tioglicólico.

Perfil de ligninas solúveis: o resíduo seco obtido na primeira fase da extração foi dissolvido em 0,5 mL de água Milli-Q e as ligninas foram extraídas com 0,6 mL de acetato de etila. A fase superior (orgânica) contendo as ligninas solúveis foi coletada, seca com N₂ e o resíduo resultante foi solubilizado em solução aquosa contendo 35 % acetonitrila. A análise das ligninas solúveis em cana-de-açúcar foi feita de acordo com Kiyota *et al.* (2012). Brevemente, os compostos foram separados em cromatógrafo líquido Acquity UPLC usando uma coluna C18-BEH (2,1 mm × 50 mm, 1,7 µm) sob um fluxo de 0,2 mL/min. A eluição utilizou um gradiente de 5 % a 100 % acetonitrila (solvente B) e uma solução aquosa com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A). A detecção dos compostos foi realizada por um espectrômetro de

massas TDQ triplo-quadrupolo (Micromass-Waters) e ionização por *eletrospray* no modo íon negativo. O espectro MS/MS foi gerado por *collision-induced dissociation* (CID) com energia de colisão de 20 V. A identificação dos precursores das ligninas (monômeros e oligômeros) foi realizada por comparação com dados de uma biblioteca de estruturas de ligninas sintéticas produzidas por nosso laboratório (Kiyota *et al.*, 2012). A identificação foi baseada em parâmetros como o tempo de retenção, a razão massa-carga (m/z) e o padrão de fragmentação *MS/MS* dos compostos.

Quantificação da lignina: o conteúdo de lignina no caule da cana foi estimado por derivatização com ácido tioglicólico (Lange *et al.*, 1995). Brevemente, 15 mg de AIR foram tratados com 1 mL de 2 M HCl e 0,2 mL de ácido tioglicólico e incubados a 95°C por 4 h. Após resfriamento, o resíduo insolúvel foi recuperado por centrifugação (25000 g por 10 min) e lavado três vezes com 1 mL de água. O pellet foi solubilizado em 1 mL de 0,5 M NaOH e mantido sob agitação overnight para extrair os derivados LTGA (lignin thioglycolic acid). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi recuperado e transferido para novo tubo e o pellet foi lavado com mais 0,5 mL de 0,5 M NaOH. As duas frações foram reunidas e homogeneizadas com 0,3 mL de HCL concentrado para permitir a precipitação da lignina (4°C por 4 h). O precipitado foi recuperado por centrifugação e o pellet (coloração amarelo-amarronzado) após secagem, foi solubilizado em 1 mL de 0,5 M NaOH. As amostras foram diluídas (10 a 40x) em 0,5 M NaOH e as absorbâncias lidas em 280 nm. A quantificação da lignina foi baseada em uma curva de calibração (2-100 µg) gerada por um padrão comercial (lignin alkali, 2-hydroxypropyl ether, Sigma Aldrich).

2.6. Análise de expressão gênica

2.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

O material congelado de entrenós imaturos e maduros do caule de cana-de-açúcar (separados em córtex e medula) foi triturado em nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó. Cerca de 200-300 mg de tecido pulverizado foi utilizado na extração de RNA total de acordo com o método CTAB (Chang *et al.*, 1993). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro em 260 nm e a qualidade das amostras foi verificada em 1 % gel de agarose corado com brometo de etídio e pela absorvância em 280 nm (pureza). Para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com Turbo DNase-free (Ambion). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total usando Superscript™ III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

2.6.2. PCR quantitativo (qPCR)

A quantidade relativa de transcritos para 12 genes relacionados à biossíntese de lignina foi estimada em diferentes tecidos do caule nos dois genótipos de cana-de-açúcar estudados. Os genes analisados e seus primers estão listados na Tabela 1. A identificação destas sequências foi feita de acordo com Bottcher *et al.* (2013). As reações de qPCR foram preparadas com o kit QuantiFast™ SYBR Green PCR (Qiagen) em placas de 96 poços utilizando cDNA diluído 50x. As placas foram analisadas no sistema iCycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection (Bio-Rad). A correção dos valores de *Ct* (*Cycle threshold*) entre as placas de um mesmo ensaio (=gene) baseou-se em uma amostra intercalibradora e foi automaticamente realizada por uma ferramenta do software iQ5 (Bio-Rad). O cálculo da expressão relativa utilizou o método $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001) e o gene de referência *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) para normalizar os valores de expressão entre as diferentes amostras (Iskandar *et al.*, 2004; Bottcher *et al.*, 2013).

Tabela 1: Nome dos genes, SAS identificadoras, sequências de primers (Bottcher *et al.*, 2013) e tamanho dos amplicons usados nas análises de qPCR.

Gene	SAS	Primers (5' → 3')	Amplicon (bp)
<i>ShPAL1</i>	SCCCLR194D07.g	For: AGGAGGAGAAGAGGAGGAAAATAC Rev: AGAAGAAAGAACAACGCCACA	150
<i>ShC4H1</i>	SCCCCL4009H01.g	For: CCGCAGATCCAGCACTATG Rev: ATCCAACACCATTCCTCAGC	148
<i>Sh4CL2</i>	SCVPLB1015F12.g	For: CACACTGGGGACATTGGTT Rev: CATTGAGACAACAGCAGCATC	162
<i>ShHCT-like</i>	SCVPRT2082B07.g	For: GCAGGTGGTAGAGTCGTCGT Rev: ATGAGGTCCAGGGGAGAGAG	81
<i>ShC3H1</i>	SCVPCL6041E07.g	For: TCACTGCTGGAATGGACACA Rev: TGTAGGTAGGGGAGGTTCTGG	163
<i>ShCCoAOMT1</i>	SCAGCL6012G12.g SCCCLR1069B09.g SCCCLR1079A02.g SCRUFL4024C06.b	For: GACCCGACAAGGACAAC Rev: CACGAAGTCGCGGTAGAAG	162
<i>ShCCoAOMT3</i>	SCJFRZ2010H06.g	For: CAGGACCAGTGCCAACATC Rev: TTTCAGCGTCTCTTTCATTACTTG	157
<i>ShCCR1</i>	SCCCRZ2C01A04.g SCBFRT1064A01.g	For: GCTGGTCGGTCTCTTATCATC Rev: CTGACGGTTCCTTGACAG	214
<i>ShF5H</i>	SCJLRT1022E04.g	For: GCACTACGGTCCCTTCTGG Rev: TCACGTTCTTGGTCAGGTTG	194
<i>ShCOMT1</i>	SCRFLR1012F12.g SCJLRT1023B09.g	For: GAGGACAAGGACGGCAAGT Rev: AGTACCAGCTCTCCATGAGGAC	139
<i>ShCAD2</i>	SCBFAM2021E08.g SCEPRZ1011A02.g	For: CCCCTACACCTACACCCTCA Rev: CACCTCACCGACCACCTC	157
<i>ShCAD8</i>	SCEQLR1029E05.g	For: ACGGCTGGAGAAGAACGAC Rev: GCAAAGCACCAACTCATCAA	154
<i>ShGAPDH</i>	SCCCCL3001G02	For: TTGGTTTCCACTGACTTCGTT Rev: CTGTAGCCCCACTCGTTGT	122

(1) Sugarcane Assembled Sequence

2.7. Estatística

O experimento foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com seis combinações de tratamento formando um fatorial 2 x 3 (dois genótipos e três regimes hídricos), com cinco replicatas biológicas. Na quantificação da lignina, os dados foram

analisados de acordo com um fatorial 2 x 3 (duas fases de maturação dos entrenós e três regimes hídricos) para cada um dos genótipos de cana-de-açúcar estudados. Cada unidade experimental foi constituída por uma planta (= 1 colmo) por vaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (software Statistica versão 10) e as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey e teste F ($P \leq 0,05$). Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média. Para as análises bioquímicas e moleculares, cada replicata representa a média de três determinações técnicas de cada amostra.

3. RESULTADOS

3.1. Biometria

Sob condição normal de irrigação, com exceção da massa seca das raízes (MS_r), observou-se que IACSP94-2094 exibiu melhores taxas de crescimento que IACSP95-5000 (tabela 2). Verificou-se, por exemplo, que quanto ao número de entrenós (N_e), comprimento do caule (C_c) e massa fresca do caule (MF_c), o desempenho das plantas IACSP94-2094 foi 22 %, 58 % e 51 % superior que o das plantas IACSP95-5000, respectivamente.

Tabela 2. Efeitos do déficit hídrico sobre o número de folhas verdes (N_f), o número de entrenós (N_e), o comprimento do caule (C_c), a massa fresca do caule (MF_c), a massa seca das folhas (MS_f) e a massa seca das raízes (MS_r) em dois genótipos de cana-de-açúcar.

Parâmetros	IACSP94-2094			IACSP95-5000		
	Controle (C)	Seca moderada (MD)	Seca severa (SD)	Controle (C)	Seca moderada (MD)	Seca severa (SD)
N_f	9,8 ± 0,4 Aa	8,0 ± 0,5 Ba	6,0 ± 0,3 Ca	7,8 ± 0,4 Ab	7,2 ± 0,6 Aa	3,8 ± 0,3 Bb
N_e	15,8 ± 0,4 Aa	15,2 ± 0,2 Aa	14,2 ± 0,2 Ba	12,4 ± 0,2 Ab	12,8 ± 0,6 Ab	12,5 ± 0,3 Ab
C_c (m)	1,49 ± 0,10 Aa	1,32 ± 0,04 Aa	1,16 ± 0,07 Ba	0,63 ± 0,03 Ab	0,55 ± 0,04 Ab	0,64 ± 0,02 Ab
MF_c (g)	491,0 ± 35,0 Aa	411,0 ± 16,5 Aa	369,2 ± 17,7 Ba	241,0 ± 4,9 Ab	188,0 ± 16,8 Bb	210,0 ± 3,5 Ab
MS_f (g)	92,64 ± 4,30 Aa	80,14 ± 3,17 Aa	68,78 ± 4,44 Ba	76,28 ± 3,32 Ab	68,50 ± 3,09 Ab	57,33 ± 1,39 Ba
MS_r (g)	56,54 ± 4,99 Aa	49,26 ± 5,12 Aa	38,93 ± 3,74 Ba	66,92 ± 6,10 Aa	65,84 ± 5,63 Aa	43,48 ± 2,23 Ba

As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro do mesmo genótipo (efeito do tratamento). As letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os genótipos dentro do mesmo regime hídrico (efeito do genótipo). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $P \leq 0,05$. Cada valor representa a média ± erro padrão de cinco replicatas (n= 5).

A restrição hídrica afetou negativa e progressivamente (relativo à intensidade do estresse) os parâmetros relacionados ao crescimento das plantas em ambos os genótipos de cana (tabela 2). A seca moderada (MD) teve poucos efeitos sobre o crescimento das plantas, de modo que apenas os parâmetros N_f (em IACSP94-2094) e MF_c (em IACSP95-5000) foram reduzidos. Sob condição de seca severa (SD), as plantas IACSP94-2094 exibiram redução

significativa de todos os parâmetros analisados, comparativamente às plantas irrigadas. Plantas IACSP95-5000 também apresentaram diminuição de N_f , MS_f e MS_r quando submetidas a estresse hídrico severo, entretanto, não exibiram alteração significativa dos parâmetros relativos ao caule (N_e e C_c).

A análise do diâmetro dos entrenós do caule mostrou que os dois genótipos de cana-de-açúcar apresentaram um perfil de crescimento semelhante sob condições normais de irrigação (fig. 4), embora o diâmetro médio do caule seja maior nas plantas IACSP95-5000 (21,25 mm) que em IACSP94-2094 (19,98 mm). Nestas condições, verificou-se que os entrenós intermediários (E4-E8) apresentaram diâmetro médio superior às demais regiões do caule, em ambos os genótipos de cana. Independentemente do regime hídrico, as plantas tenderam a apresentar menor diâmetro dos entrenós da base (maduros), com valores se aproximando daqueles obtidos para os entrenós do ápice (imaturos) (fig. 4).

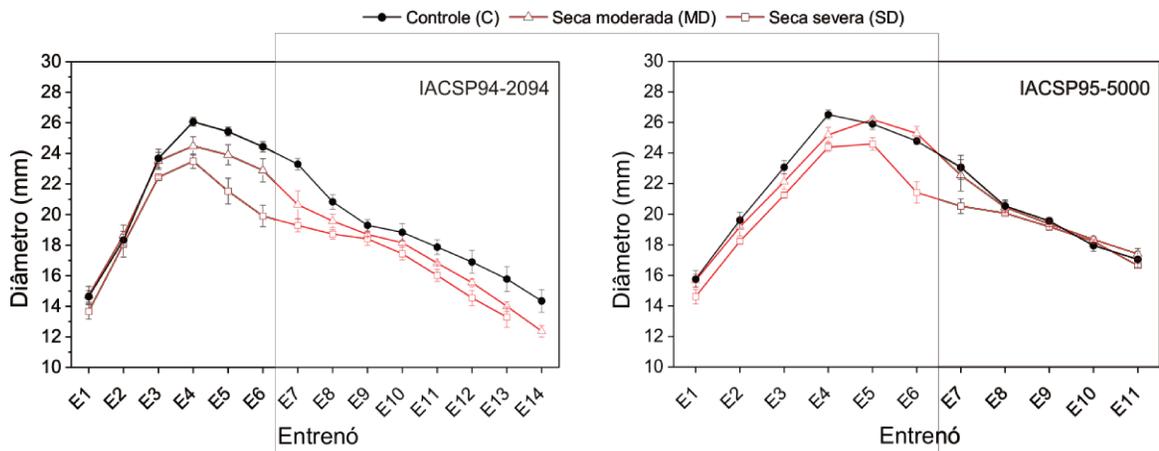


Figura 4. Diâmetro mediano dos entrenós do caule (E) em dois genótipos de cana-de-açúcar (IACSP94-2094 e IACSP95-5000) crescidos sob diferentes regimes hídricos. Cada valor representa a média \pm erro padrão de cinco replicatas ($n=5$).

O déficit hídrico levou à redução do diâmetro dos entrenós ao longo do caule, e as plantas IACSP94-2094 parecem ter sido mais fortemente afetadas, principalmente durante a seca severa. A região dos entrenós intermediários apresentou as maiores reduções, com 14,3 % em IACSP94-2094 e 9,3 % em IACSP95-5000 (fig. 4). Alterações morfológicas tais como encurtamento e/ou afinamento de entrenós foram observadas em ambos os genótipos de cana e poderiam estar associadas às condições de cultivo em casa de vegetação.

3.2. Sacarose, açúcares redutores e prolina livre

A fig. 5A mostrou que sob condições normais de crescimento, o teor de sacarose foi maior nos entrenós imaturos do genótipo IACSP94-2094 em relação às plantas IACSP95-5000, enquanto nos entrenós maduros foram observados valores similares entre os dois genótipos. Nestas condições, a quantidade de sacarose em ambos os genótipos foi cerca de 5-6 vezes superior nos entrenós maduros que nos imaturos. Plantas sob restrição hídrica (MD e/ou SD) tiveram o teor de sacarose significativamente aumentado nos entrenós imaturos. Não houve diferença significativa na sacarose acumulada nos entrenós maduros entre os genótipos de cana-de-açúcar, dentro do mesmo regime hídrico (fig. 5A).

Plantas sem restrição hídrica apresentaram maiores teores de açúcares redutores nos entrenós imaturos em relação aos entrenós maduros (fig. 5B e 5C). Considerando as plantas irrigadas, observou-se que as quantidades relativas de glicose e frutose foram maiores em IACSP94-2094 do que em IACSP95-5000 em ambos os entrenós (imaturado e maduro). Sob déficit hídrico, os teores de glicose e frutose tenderam a ser reduzidos nos entrenós imaturos em comparação às plantas irrigadas, mas apenas para a frutose essa redução foi significativa, em ambos os genótipos de cana (fig. 5C). Nos entrenós maduros, esses açúcares mantiveram valores similares aos observados nas plantas irrigadas em ambos os genótipos (exceção para as

plantas IACSP94-2094 sob seca severa, que exibiram maior teor de glicose em relação ao controle). Não foi possível quantificar frutose nas amostras do entrenó maduro de IACSP95-5000 (fig. 5C).

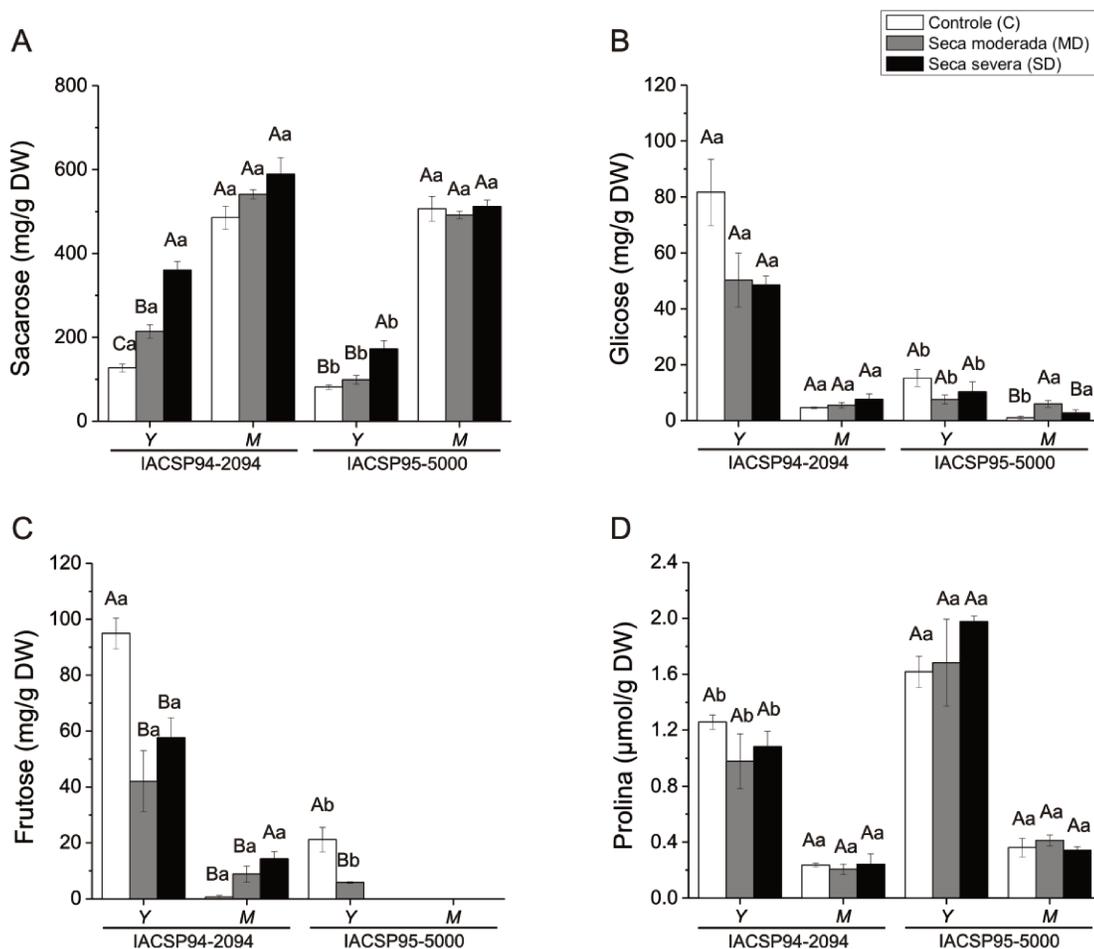


Figura 5. Efeito do déficit hídrico sobre os teores de sacarose (A), glicose (B), frutose (C) e prolina (D) no entrenó imaturo (*Young*= Y) e no entrenó maduro (*Mature*= M) em dois genótipos de cana-de-açúcar. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro do mesmo genótipo e as letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os genótipos dentro do mesmo regime hídrico. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $P \leq 0,05$ (efeito do tratamento) e pelo Teste F, $P \leq 0,05$ (efeito do genótipo). Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro replicatas.

Independentemente do regime hídrico, as plantas IACSP95-5000 sempre apresentaram maior teor de prolina nos entrenós imaturos que as plantas IACSP94-2094. Os teores de prolina livre foram superiores nos entrenós imaturos relativamente aos entrenós maduros, em ambos os genótipos. O conteúdo de prolina no caule não foi significativamente afetado pelo déficit hídrico em nenhum dos genótipos de cana avaliados (fig. 5D).

3.3. Análise qualitativa e quantitativa da lignina em cana

3.3.1. Caracterização morfo-anatômica

A análise da morfologia interna mostrou que o caule da cana-de-açúcar é constituído basicamente por células parenquimáticas que se concentram na região da medula, e por feixes vasculares, mais abundantes na região do córtex. A reação com floroglucionol evidenciou um padrão diferenciado de deposição de lignina entre os genótipos de cana-de-açúcar analisados neste estudo. O caule do genótipo IACSP94-2094 apresenta um processo de lignificação precoce e mais intenso comparado às plantas do genótipo IACSP95-5000, conforme indicado pelo espessamento das paredes celulares e pelo grau de lignificação da epiderme e dos elementos dos feixes vasculares do xilema no entrenó imaturo (figs. 6A, 6C, 6E, 6G, 7A, 7C, 7E e 7G).

Observou-se que no entrenó imaturo das plantas IACSP94-2094 os elementos traqueais do protoxilema e metaxilema já se mostram lignificados (fig. 6E e 6G), enquanto as fibras e camadas sub-epidérmicas estão em início de lignificação (fig. 6A). No entrenó maduro, a lignina está presente em quase todos os tecidos, com exceção das células do parênquima clorofiliano (fig. 6B) e das células do floema nos feixes vasculares (fig. 6F e 6H). Os tecidos tendem a se tornar muito rígidos, pois as células parenquimáticas encontram-se com paredes mais espessas e lignificadas por todo o órgão; adicionalmente, as fibras do xilema também apresentam parede celular muito espessa e lignificada (fig. 6F e 6H).

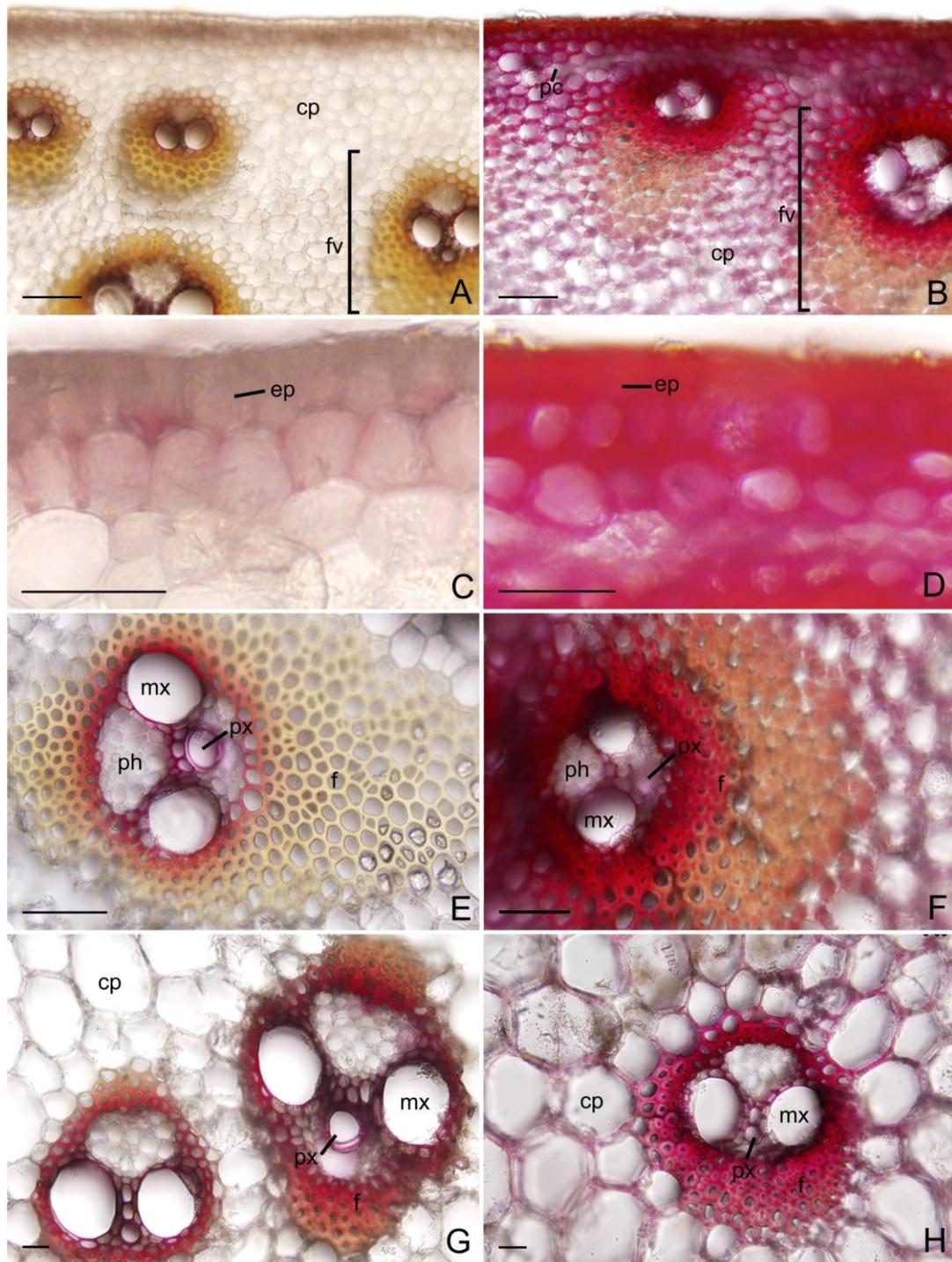


Figura 6. Secções transversais de diferentes regiões do caule da cana-de-açúcar (IACSP94-2094) submetidas ao floroglucinol ácido para detecção de lignina. Coluna da esquerda= entrenó imaturo, Coluna da direita= entrenó maduro. A-B: região do córtex; C-D: detalhe da epiderme e camadas celulares adjacentes; E-F: detalhe do feixe vascular do córtex; G-H: detalhe do feixe vascular da região da medula. cp= célula parenquimática; ep= epiderme; f=fibras; mx= metaxilema; pc= parênquima clorofiliano; ph= floema; fv= feixe vascular; px= protoxilema. Barras: A-B; E-F= 50 μ m; C-D e G-H= 20 μ m.

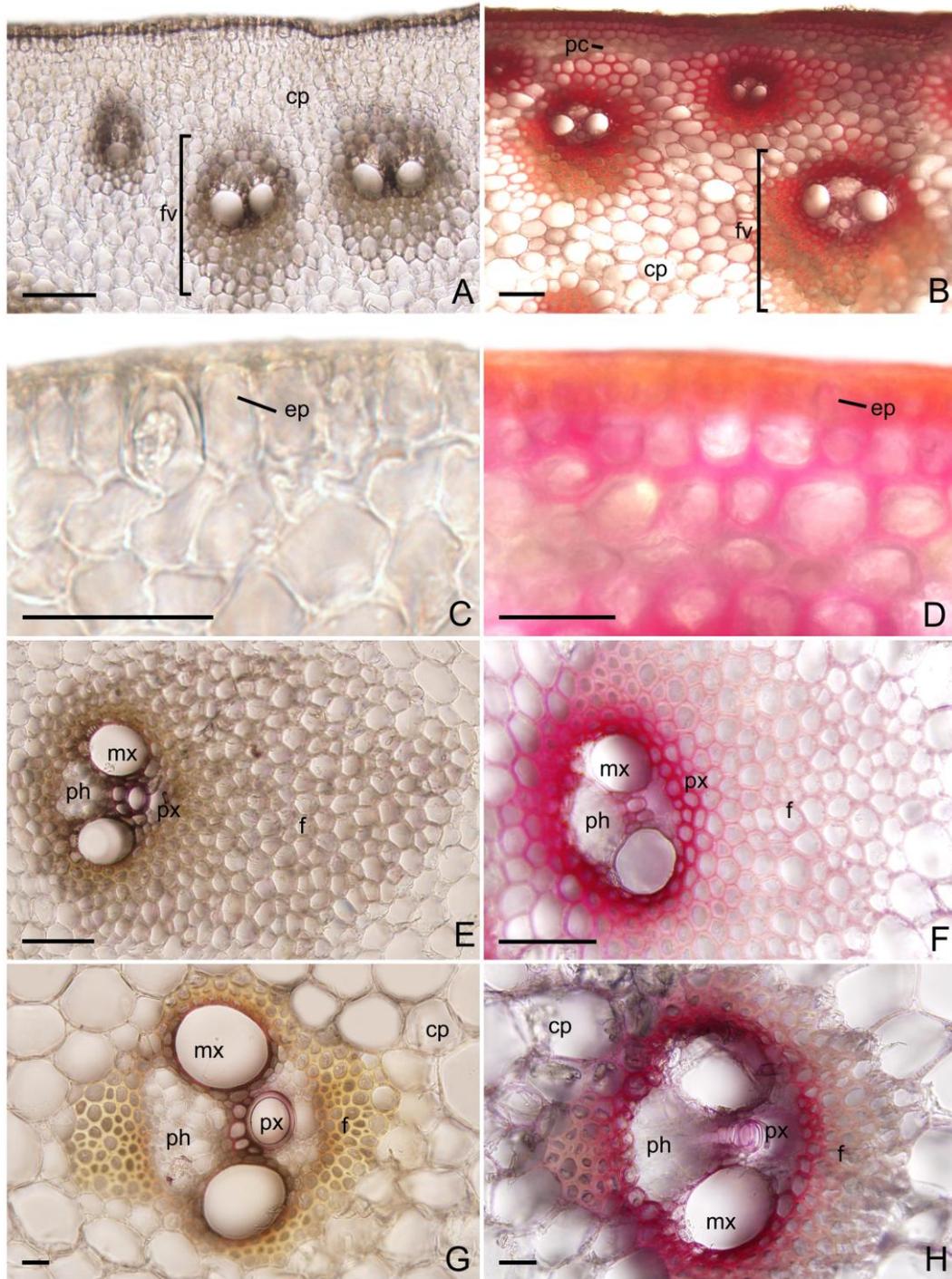


Figura 7. Secções transversais de diferentes regiões do caule da cana-de-açúcar (IACSP95-5000) submetidas ao floroglucinol ácido para detecção de lignina. Coluna da esquerda= entrenó imaturo, Coluna da direita= entrenó maduro. A-B: região do córtex; C-D: detalhe da epiderme e camadas celulares adjacentes; E-F: detalhe do feixe vascular do córtex; G-H: detalhe do feixe vascular da região da medula. cp= célula parenquimática; ep= epiderme; f= fibras; mx= metaxilema; pc= parênquima clorofiliano; ph= floema; fv= feixe vascular; px= protoxilema. Barras: A-B; E-F= 50 µm; C-D e G-H= 20 µm.

O caule das plantas IACSP95-5000 apresentou um grau de lignificação discreto no entrenó imaturo, no qual apenas os elementos traqueais do protoxilema dos feixes vasculares mostraram-se lignificados (fig. 7A, 7E, e 7G). No entrenó maduro, as células parenquimáticas encontram-se lignificadas (fig. 7F e 7H), entretanto demonstraram uma reação menos intensa na presença do floroglucinol, quando comparadas às plantas IACSP94-2094. Similarmente, as fibras também ficaram menos coradas, tanto nos feixes vasculares localizados no córtex (fig. 7B e 7F) como na medula (fig. 7H).

3.3.2. Ligninas solúveis

A análise de ligninas solúveis permitiu estabelecer o perfil de monômeros e oligômeros precursores do polímero em cana-de-açúcar, a partir da frequência dessas estruturas. Conforme indicado na tabela 3, foram identificados em cana os monolignóis G e S e seus aldeídos (coniferil e sinapil aldeído), quatro dímeros e quatro trímeros de lignina. Ligações interunidade do tipo 8-O-4 (menos recalcitrantes) foram relativamente frequentes entre as estruturas identificadas, entretanto, ligações como 8-5 e 8-8 (mais recalcitrantes) também estão presentes.

Tabela 3. Monômeros e oligômeros precursores de ligninas e suas respectivas massa-carga (m/z) obtidos por UPLC-MS/MS

Unidade	Estrutura	m/z
<i>Monômeros</i>	coniferil aldeído	177
	coniferil álcool (G)	179
	sinapil aldeído	207
	sinapil álcool (S)	209
<i>Dímeros</i>	G(8-5)H	327
	G(8-5)G	357
	S(8-8)S	417
	S(8-O-4)G	435
<i>Trímeros</i>	G(8-O-4)G(8-5)G	553
	G(8-O-4)S(8-5)G	583
	G(8-O-4)S(8-8)S	613
	S(8-O-4)G(8-O-4)S	631

De modo geral, o monômero G (coniferil álcool, m/z 179) foi encontrado com maior frequência que o monômero S (sinapil álcool, m/z 209), enquanto a unidade H (p -coumaril álcool, m/z 149) não foi detectada em cana, confirmando resultados anteriores de nosso grupo (Bottcher *et al.*, 2013). Em ambos os genótipos, os dímeros de ligninas tenderam a ser mais abundantes no córtex e na medula dos entrenós imaturos (*YR* e *YP*) que nos maduros; já os trímeros tenderam a ser mais abundantes nos entrenós maduros (fig. 8).

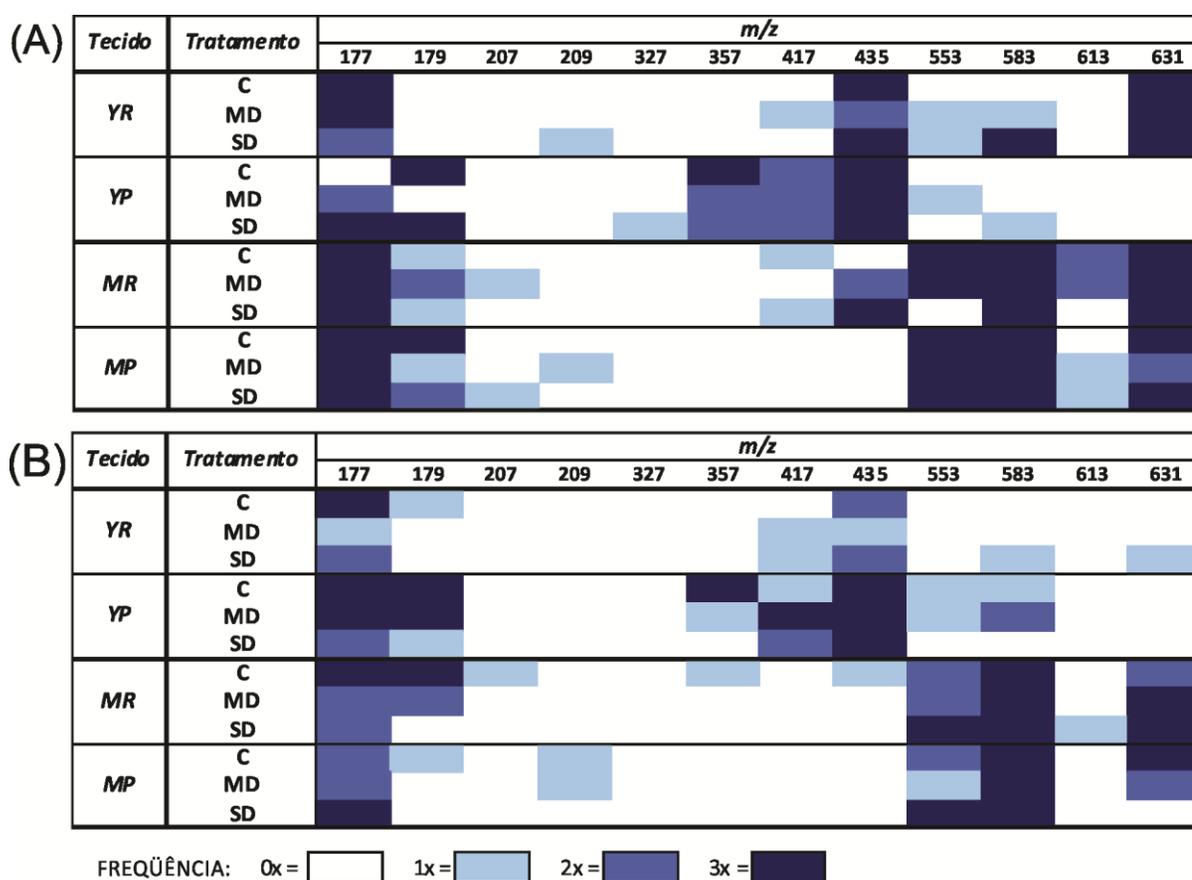


Figura 8. Determinação do padrão de ligninas solúveis por UPLC/MS em dois genótipos de cana-de-açúcar crescidos sob diferentes regimes hídricos. A frequência de cada estrutura é representada no diagrama por diferentes intensidades de cor, conforme a legenda ($n=4$ plantas). A= IACSP94-2094, B= IACSP95-5000; C= controle, MD= seca moderada, SD= seca severa; *YR*= córtex jovem, *YP*= medula jovem; *MR*= córtex maduro, *MP*= medula madura.

Nas plantas IACSP94-2094, o monômero G foi mais frequentemente detectado nos entrenós maduros que nos imaturos (fig. 8A). Sob condição de estresse, os níveis de G tenderam a ser reduzidos no entrenó maduro (córtex). Os dímeros foram mais frequentemente encontrados nos entrenós imaturos (*YR*) e a sua frequência não parece ser afetada pelo déficit hídrico. Entre os dímeros, G(8-5)H (*m/z* 327) foi o mais raro e S(8-O-4)G (*m/z* 435) o mais abundante. Dos trímeros identificados em cana, G(8-O-4)S(8-8)S (*m/z* 613) foi o menos frequente, detectado apenas nos entrenós maduros. Contrariamente, S(8-O-4)G(8-O-4)S (*m/z* 631) parece ser o trímero mais frequente na cana, estando ausente apenas na medula do entrenó imaturo. As estruturas G(8-O-4)G(8-5)G (*m/z* 553) e G(8-O-4)S(8-5)G (*m/z* 583) foram encontradas nos entrenós imaturos apenas sob condição de restrição hídrica (MD e SD).

Em IACSP95-5000, os níveis de G nos entrenós imaturos e maduros parecem ser afetados negativamente pelo déficit hídrico (fig. 8B). Os dímeros também tendem a predominar nos entrenós imaturos e sua abundância não demonstrou correlação aparente com o estresse. Nos entrenós maduros, G(8-O-4)S(8-5)G (*m/z* 583) e S(8-O-4)G(8-O-4)S (*m/z* 631) foram os trímeros mais abundantes. Nesta região, a presença de G(8-O-4)G(8-5)G (*m/z* 553) parece ser influenciada pelo regime hídrico, tendendo a aumentar sua frequência em *MR* e *MP*, sob condição de seca (MD e SD). Já S(8-O-4)G(8-O-4)S (*m/z* 631) tende a reduzir sua frequência em função do estresse.

3.3.3. Quantificação de lignina

O teor de lignina medido pelo ácido tioglicólico (*lignin thioglycolic acid*, LTGA) foi positivamente associado com o estágio de maturação dos entrenós do caule, de modo que a quantidade de lignina foi maior nos entrenós maduros do que nos imaturos. Sob condições normais de crescimento, as plantas IACSP94-2094 exibiram um teor de lignina 4,6 vezes maior no entrenó maduro do que no entrenó imaturo (região do córtex); em plantas IACSP95-

5000, essa razão é de 3,2 vezes. Nos entrenós maduros, a medula também é cerca de 2,7 vezes mais lignificada que nos entrenós imaturos, em ambos os genótipos de cana (fig. 9). O teor de lignina medido no caule das plantas irrigadas foi similar entre os dois genótipos de cana-de-açúcar analisados, a exceção da *MR* que se mostrou mais lignificada em IACSP94-2094 comparativamente às plantas IACSP95-5000.

O déficit hídrico induziu um discreto acúmulo de lignina nos entrenós imaturos (*YR* e *YP*) nos dois genótipos de cana-de-açúcar (fig. 9A e 9B). Nos entrenós maduros, as plantas IACSP95-5000 aumentaram significativamente o teor de lignina da *MR* quando submetidas a restrição hídrica severa (*SD*) (fig. 9B).

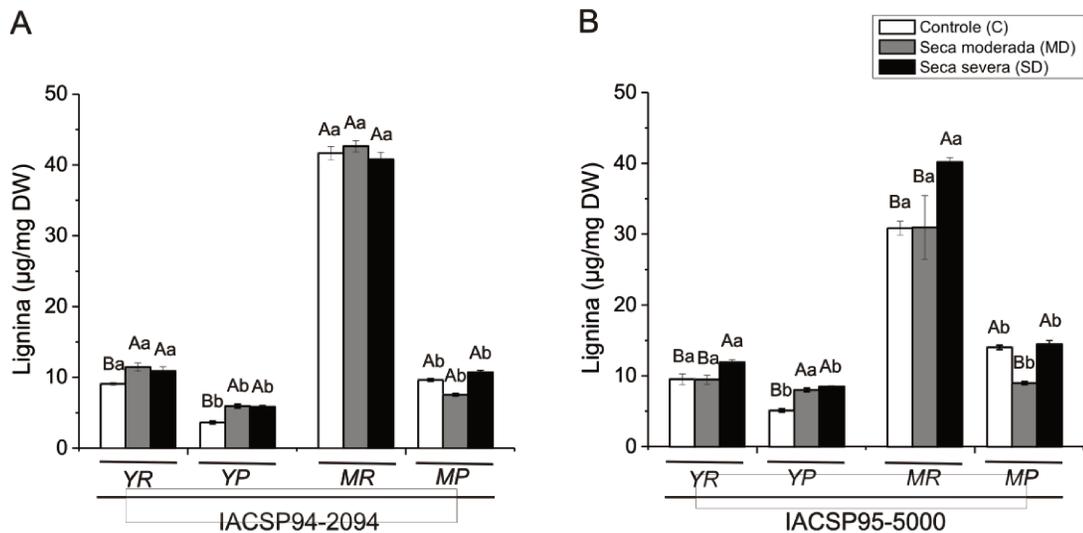


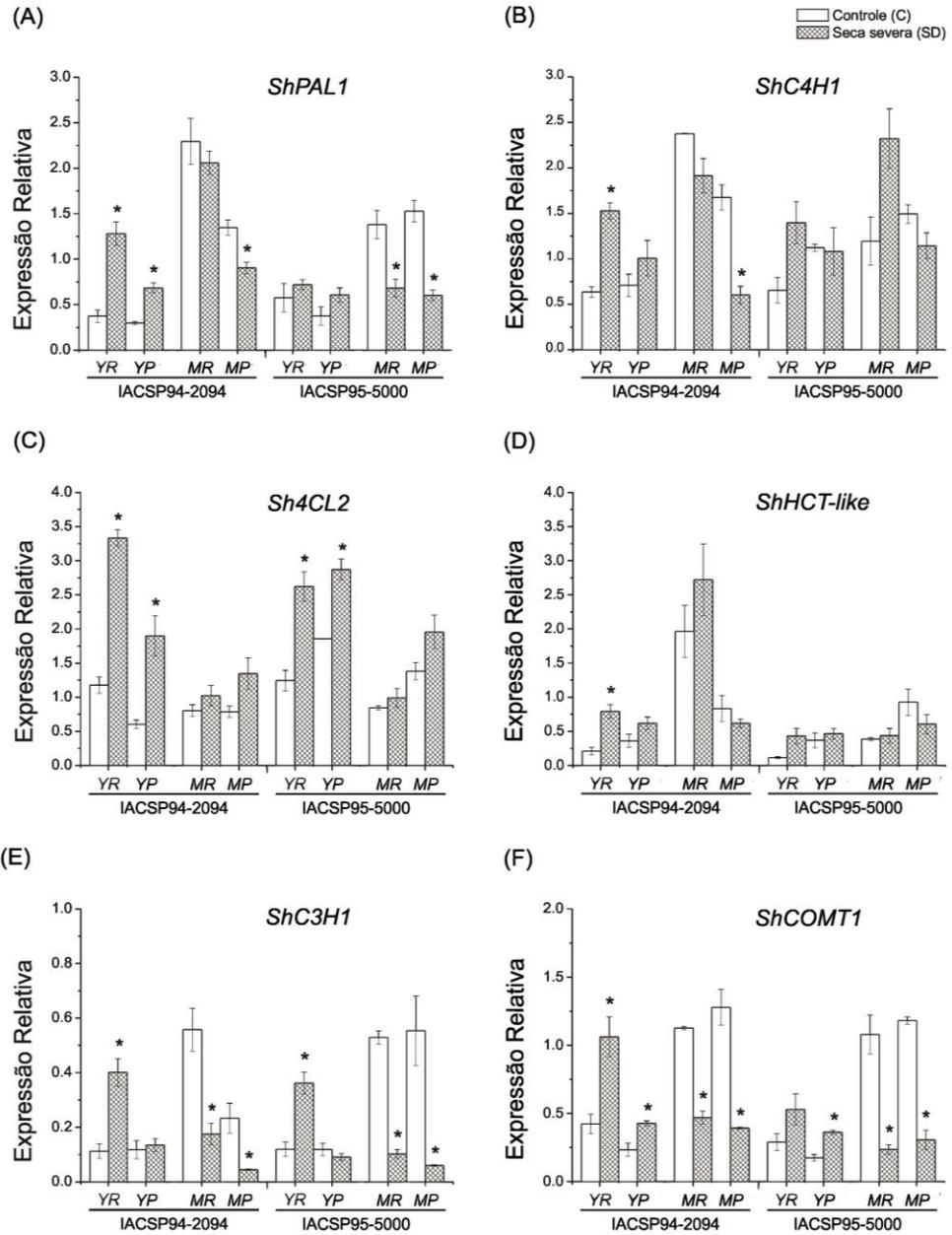
Figura 9. Efeito do déficit hídrico sobre o teor de lignina em regiões distintas do caule de dois genótipos de cana-de-açúcar. As letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os regimes hídricos dentro do mesmo entrenó e as letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os entrenós (imaturo ou maduro) dentro do mesmo regime hídrico. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $P \leq 0,05$ (efeito do tratamento) e pelo Teste *F*, $P \leq 0,05$ (efeito do entrenó/tecido). Cada valor representa a média \pm erro padrão de quatro ou cinco replicatas. A= IACSP94-2094; B= IACSP95-5000; *YR*= córtex jovem, *YP*= medula jovem; *MR*= córtex maduro, *MP*= medula madura.

3.4. Análises de expressão gênica por qPCR

A análise do padrão de expressão dos genes que codificam para algumas das enzimas da via de biossíntese de lignina em cana-de-açúcar mostrou que o acúmulo de transcritos variou de acordo com o estágio de desenvolvimento dos entrenós no caule, do tecido analisado (córtex ou medula) e do regime hídrico (fig. 10A-L). Sob condição normal de irrigação (C), a maioria dos genes analisados foram mais fortemente expressos no entrenó maduro (*MR* e/ou *MP*), a exceção de *Sh4CL2* e *ShCCoAOMT3* que para alguns tecidos exibiram maior acúmulo de transcritos no entrenó imaturo (fig. 10C e 10H). *ShCAD8* mostrou padrão de expressão similar nos entrenós imaturo e maduro (*YR*, *YP*, *MR* e *MP*) em plantas de cana sem restrição hídrica (fig. 10L). Comparando os níveis de transcritos do córtex e da medula, observou-se que a atividade dos genes analisados é predominante no córtex, independentemente do estágio de maturação dos entrenós do caule.

O déficit hídrico induziu alterações na expressão de vários genes da biossíntese de lignina (fig. 10A-L). O padrão de expressão de todos os genes analisados foi similar entre as plantas IACSP94-2094 e IACSP95-5000, embora a intensidade das respostas ao estresse seja diferente. De modo geral, a restrição hídrica severa (SD) induziu aumento de transcritos de vários genes no entrenó imaturo, principalmente na *YR*. Sob estresse hídrico, a exceção de *ShCCoAOMT3* (fig. 10H) e *ShCAD8* (fig. 10L), todos os outros genes foram significativamente mais expressos nos entrenós imaturos (*YR*) em relação à condição controle, em pelo menos um dos genótipos analisados. Similarmente, os genes *ShPAL1*, *Sh4CL2*, *ShCOMT1*, *ShCCoAOMT3* e *ShCCR1* também mostraram aumento na abundância de transcritos induzido pela seca no *YP* (figs. 10A, 10C, 10F, 10H e 10J). Contrariamente, nos entrenós maduros foi observada uma redução generalizada na expressão dos genes estudados em relação às plantas irrigadas. Transcritos dos genes *ShPAL1*, *ShC4H1*, *ShC3H1*, *ShCOMT1*,

ShCCoAOMT1, *ShCCoAOMT3*, *ShF5H*, *ShCCR1* e *ShCAD2* foram significativamente diminuídos no *MP* sob condição de estresse, em um ou nos dois genótipos de cana (figs. 10A, 10B, 10E, 10F, 10G, 10H, 10I, 10J e 10K). Essa redução dos níveis de expressão também foi observada para os genes *ShPAL1*, *ShC3H1*, *ShCOMT1*, *ShCCoAOMT1*, *ShCCoAOMT3*, *ShF5H* e *ShCAD2* na *MR*, comparativamente às plantas irrigadas (figs. 10A, 10E, 10F, 10G, 10H, 10I e 10K). Aparentemente, *ShHCT-like* e *ShCAD8* foram pouco ou nada afetados pela seca, mantendo praticamente inalterados seus níveis de expressão (fig. 10D e 10L). No anexo 1 pode-se verificar, de modo simplificado, as mudanças significativas ocorridas no nível de expressão dos genes da lignina nas plantas submetidas ao déficit hídrico severo (SD) e seus efeitos sobre o teor de lignina nos entrenós do caule.



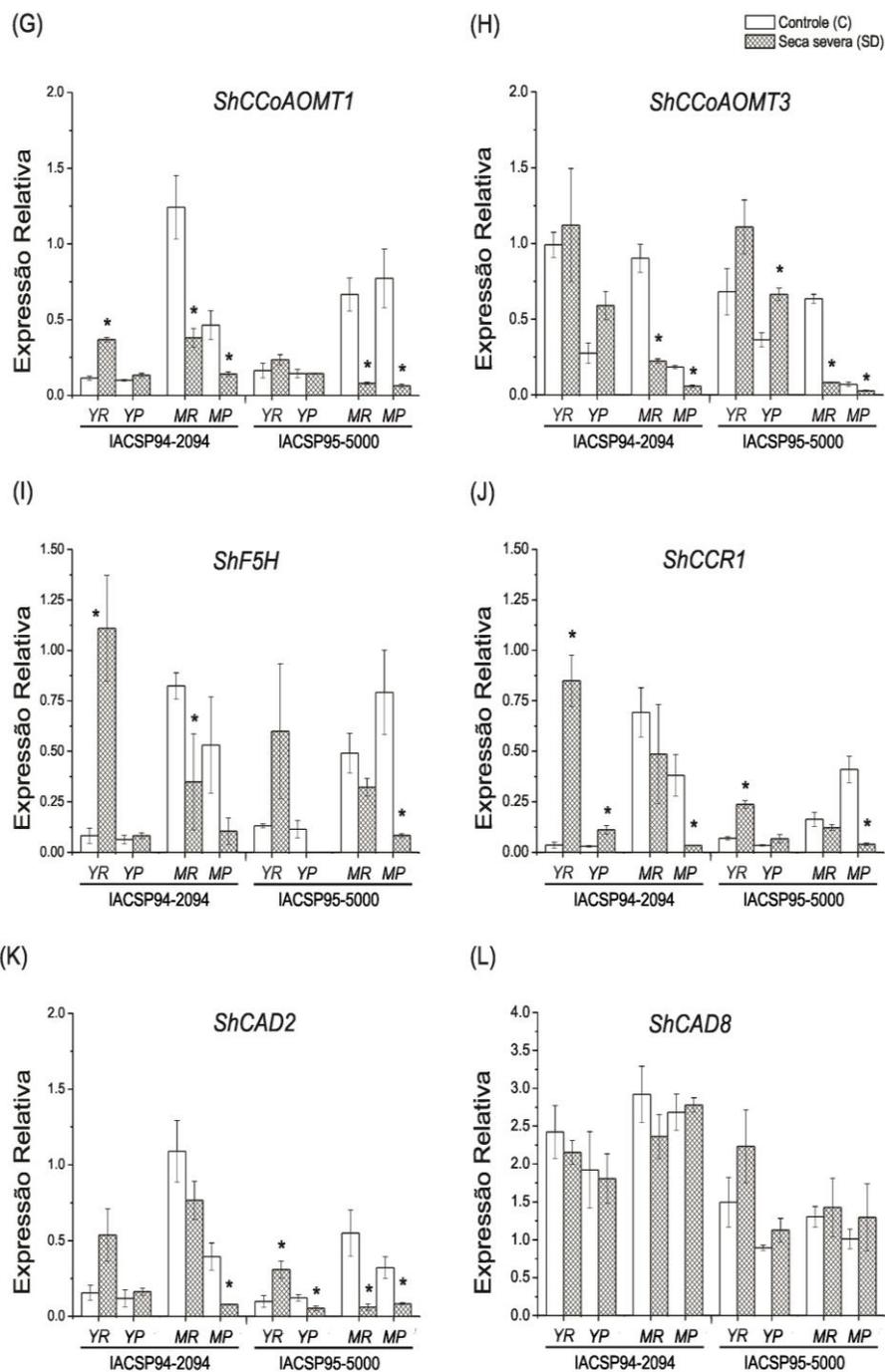


Figura 10. Expressão relativa dos genes da biossíntese de lignina mensurada por qPCR em regiões distintas do caule em dois genótipos de cana-de-açúcar submetidas a déficit hídrico (A-L). Os valores de expressão foram normalizados usando *GAPDH* como gene de referência e a expressão relativa foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_T$. Plantas estressadas (SD) marcadas com asterisco diferem das respectivas plantas controle (C) dentro do mesmo genótipo pelo Teste *F*, $P \leq 0,05$ (efeito do tratamento). Os valores representam a média da expressão relativa \pm erro padrão de três replicatas. YR= córTEX jovem, YP= medula jovem; MR= córTEX maduro, MP= medula madura.

4. DISCUSSÃO

O bagaço da cana-de-açúcar é um material co-produzido na indústria sucroalcooleira e prontamente disponível para ser utilizado na produção de etanol celulósico. A conversão da biomassa vegetal para etanol é principalmente limitada pela recalcitrância da biomassa ao ataque químico, enzimático ou microbiano (Chen & Dixon, 2007; Himmel *et al.*, 2007). Estudos envolvendo a manipulação de genes da via de biossíntese de lignina indicam que ambos teor e composição do polímero influenciam a recalcitrância da biomassa vegetal (Davison *et al.*, 2006; Chen & Dixon, 2007; DeMartini *et al.*, 2013). Assim, a lignina é um dos principais fatores limitantes ao uso da biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis.

Neste estudo, dois genótipos comerciais de cana-de-açúcar foram avaliados quanto ao efeito ‘modulador’ do déficit hídrico sobre o teor e a estrutura da lignina no caule. Alguns trabalhos têm reportado a influência do estresse hídrico sobre a biossíntese de lignina em diferentes espécies de plantas, indicando uma complexa regulação genética que pode variar de acordo com a severidade/tempo de exposição ao estresse, com a fase fenológica e com o órgão/tecido da planta entre outros fatores (Fan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2008). Em cana não há informações sobre mecanismos que regulam a biossíntese e a deposição de lignina na parede celular e como estresses ambientais tais como a seca podem afetar o processo de lignificação.

Os genótipos de cana IACSP94-2094 e IACSP95-5000 analisados neste estudo foram diferentemente afetados pelo estresse hídrico. Essa diferença poderia estar relacionada à maior taxa de crescimento exibida pelas plantas IACSP94-2094 comparativamente às plantas IACSP95-5000, conforme verificado sob condição irrigada. Embora o genótipo IACSP94-2094 seja caracterizado como tolerante à seca (Machado *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2013),

plantas submetidas à restrição hídrica severa e prolongada, apresentaram redução significativa de todos os parâmetros biométricos analisados (N_f , MS_f , N_e , A_c , MF_c e MS_r), enquanto IACSP95-5000 foi menos afetada e exibiu diminuição de N_f , MS_f e MS_r (tabela 2). O número de folhas verdes (N_f) e a biomassa da raiz (MS_r) sofreram as maiores reduções nos dois genótipos de cana, sendo 39 % e 31 % nas plantas IACSP94-2094 e, 51 % e 35 % em IACSP95-5000, respectivamente. De fato, Inman-Bamber (2004) reportou quedas significativas na produção de biomassa da cana-de-açúcar devido à seca, atingindo perdas de até 35 % da fitomassa.

Adicionalmente, a baixa performance das plantas IACSP94-2094 sob restrição hídrica poderia estar relacionada à severidade e/ou tempo de exposição ao estresse hídrico, uma vez que sob estresse moderado (MD) apenas N_f foi significativamente reduzido. Em cana-de-açúcar a redução do número de folhas e a senescência foliar durante o déficit hídrico poderiam indicar uma estratégia da planta para diminuir a superfície transpirante, reduzindo o gasto energético para a manutenção do metabolismo basal nos tecidos (Inman-Bamber & Smith, 2005; Smit & Singels, 2006; Inman-Bamber *et al.*, 2008).

O impacto do déficit hídrico sobre a produtividade da cana-de-açúcar parece estar relacionado à fase de crescimento das plantas. Alguns trabalhos indicam que a cana torna-se mais suscetível ao déficit hídrico durante a fase inicial de formação, caracterizada pelo crescimento acelerado e perfilhamento da planta (Ramesh, 2000; Machado *et al.*, 2009). Paralelamente, outros autores apontam que a maior suscetibilidade à seca ocorre durante a fase de alongamento dos caules com significativas reduções da fitomassa e do acúmulo de sacarose (Robertson *et al.*, 1999; Inman-Bamber & Smith, 2005). Nossos resultados confirmam que o déficit hídrico imposto durante a fase de alongamento dos caules induziu estresse hídrico nas plantas, afetando o crescimento e, conseqüentemente, a produção de biomassa.

A cana-de-açúcar caracteriza-se pela capacidade de acumular grandes quantidades de sacarose no caule e seu teor aumenta com a maturidade dos entrenós (Rose & Botha, 2000). Em conjunto, sacarose e açúcares redutores representam a maior fração dos açúcares solúveis totais presentes no caule. Esses açúcares têm suas proporções alteradas nos diferentes estágios de maturação dos entrenós e são negativamente correlacionados um com o outro (Pan *et al.*, 2009). De fato, os resultados obtidos para as plantas IACSP94-2094 e IACSP95-5000 confirmam que nos estágios iniciais de desenvolvimento, quando as taxas de crescimento são máximas, o teor de açúcares redutores (frutose e glicose) foi maior que o de sacarose nos entrenós imaturos. O contrário foi observado durante a maturidade, quando o acúmulo de sacarose foi potencializado e o teor dos açúcares redutores tornou-se muito baixo (fig. 5A-C).

A restrição hídrica afeta negativamente a fotossíntese devido a limitações estomáticas e não-estomáticas (Ghannoum, 2009). A baixa disponibilidade hídrica provocou algumas alterações no balanço de açúcares no colmo, que funciona como um órgão dreno na cana-de-açúcar. Nos entrenós imaturos, o acúmulo de sacarose e a redução do teor de frutose foram simultaneamente induzidos pela seca em ambos os genótipos analisados (fig. 5A-C), o que deve estar relacionado à redução das taxas de crescimento dos entrenós durante o déficit hídrico. A menor demanda do dreno (entrenós em alongamento) levaria à diminuição da hidrólise da sacarose, favorecendo a reação de síntese/armazenamento de sacarose nos entrenós jovens. Contrariamente, resultados obtidos em plantas do cultivar Q117 submetidas ao déficit hídrico não apontaram nenhuma alteração significativa nas quantidades de sacarose e açúcares redutores nos entrenós jovens (Iskandar *et al.*, 2011).

Por outro lado, nos entrenós maduros os teores de sacarose e açúcares redutores não foram afetados pelo déficit hídrico. Considerando a menor taxa de exportação de sacarose decorrente da queda da atividade fotossintética nas plantas sob estresse hídrico, é possível que

a manutenção do *pool* de açúcares nesses entrenós esteja relacionada à dinâmica de clivagem e re-síntese celular de sacarose, processo regulado pela atividade das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS), sacarose sintase (SUSY) e invertases (Botha & Black, 2000). Nossos resultados foram parcialmente corroborados pelo estudo realizado por Iskandar *et al.* (2011), no qual os autores mostraram que embora o teor de sacarose não tenha sido alterado, os teores de glicose e frutose foram aumentados nos entrenós maduros de plantas de cana-de-açúcar durante o déficit hídrico. A intensidade e/ou tempo de exposição ao estresse hídrico poderiam explicar essas respostas fisiológicas aparentemente distintas.

Paralelamente, é preciso enfatizar que alguns açúcares como a glicose, a trealose e a sacarose podem atuar como importantes moléculas sinalizadoras durante o crescimento e ao longo do desenvolvimento das plantas, regulando diversos processos fisiológicos tais como a fotossíntese, a partição de energia e as respostas de defesa contra estresses ambientais (Smeekens, 2000; Koch, 2004). Moléculas como sacarose e glicose funcionam como eficientes moduladores da expressão gênica (Koch, 1996). Com efeito, um expressivo número de genes relacionados ao teor de sacarose foi identificado em cana-de-açúcar por serem regulados em resposta à seca (69 genes) e ao ácido abscísico (11 genes), indicando que rotas metabólicas associadas com o acúmulo de sacarose e o desenvolvimento do caule poderiam estar interligadas com rotas de sinalização a diversos estresses abióticos (Papini-Terzi *et al.*, 2009).

Prolina é considerada um soluto compatível que se acumula nos tecidos das plantas em resposta ao estresse osmótico e parece contribuir para o ajuste osmótico, estabilização das macromoléculas e proteção contra danos oxidativos (Zhang *et al.*, 1999). Recentemente, alguns trabalhos desenvolvidos em cana-de-açúcar têm proposto uma discussão sobre o potencial papel da prolina no ajuste osmótico durante o déficit hídrico. De acordo com

Iskandar *et al.* (2011) as baixas concentrações de prolina encontradas no caule da cana sob estresse hídrico e a correlação negativa entre o teor de prolina e o aumento do teor de sacarose no caule, comprovariam que esse aminoácido não tem função de osmoprotetor na cana-de-açúcar.

Neste estudo, o teor de prolina livre no caule foi similar entre plantas irrigadas nos genótipos IACSP94-2094 e IACSP95-5000 e, sob condição de déficit hídrico severo, nenhuma alteração significativa na quantidade desse aminoácido foi detectada no caule (fig. 5D). Estes resultados indicam que a prolina não tem papel osmoprotetor no caule em eventos de déficit hídrico prolongado, quando outros mecanismos de aclimação/resistência mais efetivos poderiam ser recrutados pela planta. Do mesmo modo, o uso da prolina como marcador bioquímico para o estresse hídrico deverá ser visto com cautela, uma vez que em cana o teor desse aminoácido pode variar com a severidade e/ou tempo de exposição ao estresse (Cia *et al.*, 2012) e a fase de desenvolvimento da planta (Queiroz *et al.*, 2011).

A anatomia do caule da cana-de-açúcar observada em nossas análises foi consistente com a literatura (Moore, 1987) e evidenciou a típica organização do entrenó em duas regiões morfológicamente distintas: o córtex (*rind*), caracterizado por um grande número de feixes vasculares e a medula (*pith*), região onde predominam as células do parênquima de reserva. Uma estimativa do número de feixes vasculares nos entrenós da cana mostrou que cerca de 50 % deles estão localizados na faixa de 3 mm contados a partir do córtex (Walsh *et al.*, 2005).

A comparação entre o padrão de deposição de lignina nos diferentes entrenós do caule em dois genótipos de cana mostrou que a lignificação em IACSP94-2094 ocorre mais precocemente que em IACSP95-5000 (figs. 5 e 6). A análise do entrenó imaturo corrobora tal constatação, pois enquanto nos feixes vasculares de IACSP95-5000 apenas o protoxilema mostrou-se lignificado, IACSP94-2094 apresenta protoxilema e metaxilema lignificados, além

de lignificação inicial das fibras e camadas subepidérmicas. Da mesma forma, as células do parênquima de reserva do entrenó maduro também se apresentam lignificadas e as fibras do xilema exibem paredes bastante espessadas e lignificadas. Walsh *et al.* (2005) encontraram que as paredes das células do parênquima são lignificadas com a maturação dos entrenós, sendo que no entrenó quatro o índice de lignificação fica em torno de 5 %, enquanto no entrenó dez esse valor pode atingir 60 % dessas células.

De fato, as medições dos teores de lignina no caule da cana-de-açúcar confirmaram que o acúmulo do polímero variou com a maturação dos entrenós (imaturo/*Y* ou maduro/*M*) e também de acordo com a região do entrenó (córtex/*R* ou medula/*P*). Assim, entrenós maduros foram mais lignificados que os imaturos e, dentro de cada entrenó, o córtex exibiu maior teor de lignina que a medula, o que foi associado à maior concentração de feixes vasculares na região do córtex do entrenó e à progressiva lignificação da epiderme e hipoderme. Assim, observou-se que *MR* chegou a ser 4,6 vezes mais lignificada que *YR* em IACSP94-2094, enquanto em IACSP95-5000 esse aumento foi de 3,2 vezes; na região da medula, o teor de lignina foi 2,7 vezes maior no *MP* do que em *YP*, em ambos os genótipos de cana (fig. 8A e 8B). A maior lignificação do córtex observada no caule da cana-de-açúcar é consistente com a maior atividade de peroxidases detectadas nessa região, que poderiam estar envolvidas na polimerização da lignina (Cesarino *et al.*, 2012).

Estudos dedicados à análise da composição do bagaço da cana-de-açúcar têm reportado diferentes teores de lignina no caule, fato principalmente relacionado ao método adotado para a determinação da lignina, além de outros fatores como a idade das plantas (de Souza *et al.*, 2013) e a variação genotípica (Masarin *et al.*, 2011). De fato, um estudo utilizando 11 híbridos incluídos em um programa de melhoramento que busca selecionar plantas com baixos níveis de lignina mostrou que entre esses híbridos o teor de lignina no bagaço variou de 17 a 24 %

(Masarin *et al.*, 2011). Estudo recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa avaliou o teor de lignina ao longo do perfil do caule em dois genótipos de cana-de-açúcar pelo método Klason (lignina insolúvel) identificando teores que variaram de 7 a 12,5 % no genótipo com baixo teor de lignina e 7,5 a 16 % no genótipo com alto teor de lignina (Bottcher *et al.*, 2013). Adicionalmente, foi demonstrado que a razão S/G variou com a maturidade do caule, com o tecido analisado (medula ou córtex) e também em relação aos diferentes genótipos de cana-de-açúcar estudados (Bottcher *et al.*, 2013).

No presente estudo, o teor de lignina avaliado a partir dos resíduos álcool insolúveis (AIR) do caule em dois genótipos de cana variou de 0,4 % em *YP* (menor teor) a 4,2 % em *MR* (maior teor). Baixos teores de lignina estimados pelo método do ácido tioglicólico em cana-de-açúcar também foram reportados por de Souza *et al.* (2013) em plantas jovens, sendo 4,9 % nas folhas e 2,5 % no caule. A alta especificidade associada ao método somada ao fato de que uma fração significativa da lignina de gramíneas possui caráter ácido-solúvel (permanecendo, portanto, em solução durante a etapa de precipitação em ácido), poderia conduzir a valores subestimados da lignina total (Hatfield & Fukushima, 2005). Independentemente das questões relativas ao método, nossos resultados demonstraram o acúmulo diferencial de lignina nos entrenós imaturo e maduro e também entre a medula e o córtex.

Embora baixos níveis de lignina sejam desejáveis em plantas que deverão ser utilizadas para a produção de etanol celulósico, a produtividade de biomassa também é relevante e, particularmente no caso da cana-de-açúcar, o rendimento de sacarose assume grande importância. Nesse sentido, Masarin *et al.* (2011) demonstraram que apenas dois entre onze híbridos experimentais de cana (< 20 % da população) combinaram alta produtividade de sacarose e biomassa com menores teores de lignina, enquanto os demais híbridos variaram níveis mais elevados de lignina com alta/baixa produtividade de biomassa ou sacarose.

Plantas estão frequentemente expostas a diversos estresses ambientais tais como seca, baixas temperaturas, radiação ultravioleta (UV-B), deficiência mineral, infecção por patógenos entre outros que podem levar a mudanças no teor e/ou composição da lignina (para revisão ver Moura *et al.*, 2010). A biossíntese de lignina obedece um controle genético bastante complexo, resultando em diferentes respostas adaptativas que podem variar durante o crescimento e o desenvolvimento da planta (Rogers & Campbell, 2004). Particularmente em relação ao estresse hídrico, diversos trabalhos encontraram que a expressão de genes da via de biossíntese e/ou o teor de lignina podem ser alterados de acordo com o tempo e/ou intensidade do estresse (Yang *et al.*, 2006; Yoshimura *et al.*, 2008), com o órgão e suas regiões específicas (Vincent *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006) e tipos celulares específicos (de Souza *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos nesse estudo indicaram que o déficit hídrico alterou a deposição de lignina no caule dos genótipos de cana-de-açúcar analisados, induzindo um acúmulo significativo dos teores do polímero nos entrenós imaturos, com aumento de 20 % na *YR* e 61 % na *YP* nas plantas IACSP94-2094 e 25% na *YR* e 66 % na *YP* em IACSP95-5000 comparativamente às respectivas plantas irrigadas. Adicionalmente, as plantas IACSP95-5000 submetidas à seca severa acumularam 30 % mais lignina na *MR* comparativamente às plantas irrigadas, demonstrando que a resposta adaptativa desse genótipo à seca envolve, direta ou indiretamente, mudanças no metabolismo de lignina no caule. O súbito acúmulo de lignina nas plantas IACSP95-5000, genótipo com menor nível de lignificação do caule, conforme evidenciado pelas análises anatômicas e lignina, em particular no córtex, poderia indicar uma estratégia para aumentar a resistência dos vasos do xilema para suportar as maiores tensões geradas durante eventos de déficit hídrico e reduzir as perdas de água. Voelker *et al.* (2011) mostraram que o reduzido grau de lignificação de plantas transgênicas de *Populus* spp. silenciadas para o gene *4CL* aumentou a vulnerabilidade do xilema ao embolismo.

O teor, a composição e a estrutura da lignina podem ser amplamente variáveis entre diferentes espécies de plantas e também entre os distintos tecidos dentro do mesmo organismo (del Rio *et al.*, 2012). A complexidade estrutural da lignina parece estar diretamente relacionada à frequência relativa das diferentes ligações interunidade, que por sua vez dependem da abundância de cada monômero durante o processo de polimerização. Assim, ligninas formadas principalmente por unidades G (por ex., nas coníferas) contêm maior número de ligações resistentes tais como 8–5, 8–8, 5–5 e 5-O-4 do que ligninas enriquecidas em unidades S, sendo por isso mais resistentes à degradação química (Boerjan *et al.*, 2003).

Em cana-de-açúcar, um estudo recente utilizou UPLC–MS/MS para identificar ligninas solúveis (monômeros e oligômeros) e naturalmente sintetizadas pela planta, sugerindo que a composição das ligninas não polimerizadas poderia ser usada para inferir sobre a composição e a recalcitrância da biomassa de cana (Kiyota *et al.*, 2012). Adicionalmente, os autores apontaram que as estruturas identificadas em cana poderiam ser indicativas da abundância relativa dos monômeros e os tipos de ligação inter-unidade formados entre os oligômeros poderiam ser úteis na caracterização do material lignocelulósico derivado da cana-de-açúcar. Embora esses dados tragam novas perspectivas sobre o processo de lignificação em plantas, não é possível estabelecer uma correlação direta entre a frequência desses oligômeros e a deposição da lignina na parede celular, pois o polímero é formado pelo acoplamento randômico de monolignóis ao polímero em crescimento e não pela incorporação de oligômeros pré-formados (Boerjan *et al.*, 2003; Morreel *et al.*, 2004).

A análise de ligninas solúveis de IACSP94-2094 e IACSP95-5000 mostrou que independentemente do grau de maturação (jovem ou maduro) e da região do caule (córTEX ou medula), a frequência do monômero G (coniferil) foi sempre maior que S (sinapil). Assim como observado por Bottcher *et al.* (2013), unidades H (*p*-hidroxifenil) não foram encontradas

em cana, provavelmente devido às baixas concentrações (tipicamente <5 %) desse monômero mesmo entre gramíneas (Vanholme *et al.*, 2012). Os oligômeros de lignina identificados neste trabalho foram positivamente correlacionados com o grau de maturação dos entrenós da cana, de modo que os dímeros foram mais frequentes nos entrenós imaturos e os trímeros, mais abundantes nos entrenós maduros (fig. 8). Similarmente, Bottcher *et al.* (2013) observaram que oligômeros de lignina eram preferencialmente acumulados nos entrenós maduros em duas cultivares de cana-de-açúcar, o que se deve a maior deposição de lignina associada à maturação dos tecidos.

Nossos resultados mostraram que o perfil dos oligômeros variou de acordo com as diferentes regiões dos entrenós da cana (córtex ou medula). Por exemplo, S(8-O-4)G foi mais abundante no entrenó jovem e, relativamente foi o único dímero encontrado no córtex, enquanto na medula outras estruturas como G(8-5)G e S(8-8)S foram identificadas em proporções semelhantes à S(8-O-4)G. A frequência de alguns oligômeros também foi afetada pelo déficit hídrico, com estruturas como S(8-8)S, G(8-O-4)G(8-5)G e G(8-O-4)S(8-5)G sendo encontradas em *YR* apenas sob condição de estresse, enquanto outros oligômeros tais como G(8-O-4)G(8-5)G e G(8-O-4)S(8-8)S tenderam a reduzir sua abundância na *MR* relativamente ao controle irrigado.

Assim, embora esses dados não sejam suficientes para explicar prováveis alterações na deposição de lignina induzidas pelo estresse hídrico, poderia constituir um indício de mudanças no *pool* inicial de monômeros (principalmente, das unidades S e G), que por consequência, levariam a variações na composição do polímero. Com efeito, a razão S/G varia durante o desenvolvimento do caule em cana-de-açúcar e também entre a medula e o córtex, de modo que os valores de S/G foram significativamente mais elevados no córtex jovem do que no córtex dos entrenós intermediário e maduro, o que parece estar relacionado aos maiores

níveis de unidades G liberadas na tioacidólise (Bottcher *et al.*, 2013). Contrariamente, constatou-se que a razão S/G tende a aumentar na medula da cana com a maturação dos entrenós, sugerindo que a síntese de unidades S nessa região é positivamente relacionada com a maturidade.

Alterações no teor e na composição da lignina estão diretamente relacionadas à ativação ou repressão dos genes da via de biossíntese do polímero. Estudos com mutantes e plantas transgênicas para diferentes genes que codificam enzimas da via têm mostrado que reduções na expressão desses genes levam, em geral, a reduções no teor da lignina em graus variados, dependendo do gene e seu respectivo nível de redundância e da espécie (Li *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2008; Vanholme *et al.*, 2008). Paralelamente, Marita *et al.* (1999) demonstraram que *Arabidopsis F5H*-deficiente produziram ligninas formadas quase que completamente por unidades G, diferentes das proporções de G e S típicas das dicotiledôneas, enquanto que plantas transgênicas super-expressando *F5H* foram caracterizadas com elevado teor de unidades S.

A deposição de lignina está associada à maturidade dos órgãos vegetais e aos estágios finais de diferenciação dos tipos celulares (Boerjan *et al.*, 2003), o que naturalmente, tende a elevar os níveis de expressão dos genes da biossíntese de lignina nessas regiões. Sob condições normais de crescimento foi constatado que o acúmulo de transcritos nos entrenós maduros da cana foi maior do que nos entrenós imaturos (fig. 10A-L). A análise comparativa entre o perfil de expressão dos dois genótipos de cana-de-açúcar evidenciou que nas plantas IACSP94-2094 a abundância de transcritos no córtex maduro (*MR*) foi maior do que nas plantas IACSP95-5000 (exceção para *Sh4CL2* e *ShC3H1*). Os altos níveis de expressão observados em IACSP94-2094 corroboraram os resultados das análises anatômicas e da lignina, confirmando que esse genótipo de cana possui maior nível de lignificação do caule.

Diversos estresses ambientais como a seca, o frio e infecção por patógenos podem alterar o perfil de expressão dos genes da via de biossíntese levando a mudanças no teor e/ou composição da lignina nas plantas (Moura *et al.*, 2010). Plantas de cana-de-açúcar submetidas a déficit hídrico severo (SD) apresentaram significativas alterações dos níveis de expressão da maioria dos genes analisados, com aumento generalizado de transcritos no entrenó jovem (exceção de *ShCAD8*) e redução da expressão no entrenó maduro (fig. 10), situação oposta àquela verificada nas plantas controle que tenderam a exibir maiores níveis de expressão dos genes da biossíntese de lignina nos entrenós maduros. Esses achados foram consistentes com o maior teor de lignina (> 60 % em relação ao controle) observado na medula dos entrenós jovens (YP) para ambos os genótipos de cana sob condição de déficit hídrico (fig. 9A e 9B).

Contrariamente aos dados reportados neste estudo, Vincent *et al.* (2005) encontraram que o déficit hídrico levou à redução dos níveis de *COMT* na zona de alongação das folhas jovens (em expansão) de milho, resultando em menores taxas de lignificação nessa região, o que poderia significar uma resposta adaptativa durante o estresse e uma vantagem quando da retomada do crescimento após a reidratação. No presente estudo, além da maior expressão de *ShCOMT1* (fig. 10F), também foi verificado um aumento significativo de transcritos do gene *Sh4CL2* (fig. 10C) em ambos os genótipos de cana, que foram positivamente relacionados com o maior teor de lignina no entrenó imaturo das plantas sob déficit hídrico severo.

Por outro lado, a redução na expressão da maioria dos genes da biossíntese de lignina (a exceção de *ShC4H1*) nos entrenós maduros do caule sob condição de seca não explica o aumento de cerca de 30 % no teor de lignina na MR das plantas IACSP95-5000 comparativamente às plantas de cana irrigadas. A alta complexidade do genoma dos modernos cultivares de cana-de-açúcar (híbridos aloploplóides) associada a possíveis redundâncias funcionais entre os vários membros de uma mesma família gênica (Bottcher *et al.*, 2013)

poderiam justificar a aparente falta de correlação entre baixa expressão desses genes e alto teor de lignina observados neste contexto.

Sob condição de restrição hídrica severa, *ShF5H* e *ShCCR1* foram os genes mais diferencialmente expressos em IACSP94-2094, cerca de 13 e 24 vezes mais expressos na *YR* sob déficit hídrico severo que nas plantas controle, respectivamente (fig. 10I e 10J). *ShF5H* codifica uma enzima chave para a produção de unidades S da lignina e o acúmulo de seus transcritos na região do córtex (rica em feixes vasculares) poderia estar relacionado à intensificação da deposição de lignina nos entrenós jovens induzida pelo estresse, uma vez que o aumento de unidades S está relacionada à formação das paredes secundárias (He & Terashima, 1990).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, nós mostramos que a deposição de lignina nos entrenós do colmo foi afetada pelo déficit hídrico severo em dois genótipos de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos para os teores de lignina somados à caracterização anatômica da lignina no caule indicaram que, sob condição normal de crescimento, as plantas IACSP94-2094 mostraram-se mais lignificadas que IACSP95-5000. O perfil de expressão dos genes relacionados à biossíntese de lignina confirmou que o acúmulo de transcritos dos genes analisados aumentou com a maturidade dos entrenós e, de modo geral, o nível de expressão foi sempre maior no córtex do que na medula. O aumento de cerca de 60 % no teor de lignina induzido pelo déficit hídrico na medula dos entrenós jovens, em ambos os genótipos, foi positivamente relacionados ao acúmulo dos transcritos de *Sh4CL2* e *ShCOMT1*, sugerindo que esses genes poderiam desempenhar um papel crucial no controle da deposição de lignina em cana. Nossos dados reforçam a complexidade de mecanismos envolvidos no controle espaço-temporal da deposição da lignina e, em adição, constatamos que o déficit hídrico severo afetou negativamente a produtividade da cana-de-açúcar e levou ao aumento dos teores de lignina nos entrenós jovens. Considerando tais resultados, estudos complementares seriam necessários para analisar as implicações do acúmulo de lignina na região imatura do colmo sobre a qualidade final da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar.

6. REFERÊNCIAS

- Alvarez, S., Marsh, E.L., Schroeder, S.G. & Schachtman, D.P., 2008. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell Environ.*, 31: 325-340
- Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapiere, C., Pollet, B. & Legrand, M., 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, 19: 148-162
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 519-546
- Bonawitz, N.D. & Chapple, C., 2013. Can genetic engineering of lignin deposition be accomplished without an unacceptable yield penalty? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24: 336-343
- Botha, F. C. & Black, K. G., 2000. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27: 81-85
- Bottcher, A., Cesarino, I., Santos, A.B., Vicentini, R., Mayer, J.L.S., Vanholme, R., Morreel, K., Goemmine, G., Moura, J.C.M.S., Nobile, P.M., Carmello-Guerreiro, S.M., Anjos, I.A., Creste, S., Boerjan, W., Landell, M.G.A. & Mazzafera, P., 2013. Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. *Plant Physiol.*, 163: 1539-1557
- Campbell, M.M. & Sederoff, R.R., 1996. Variation in lignin content and composition - mechanism of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.*, 110: 3-13
- Cesarino, I., Araujo, P., Mayer, J.L.S., Leme, A.F.P. & Mazzafera, P., 2012. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. *Plant Physiol Biochem.*, 55: 66-76
- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11: 113-116
- Chen, F. & Dixon, R.A., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnol.*, 25: 759-761

- Cia, M.C., Guimaraes, A.C.R., Medici, L.O., Chabregas, S.M. & Azevedo, R.A., 2012. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. *Ann. Appl. Biol.*, 161: 313-324
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - 2013. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (terceiro levantamento da safra 2013/2014), Brasília, DF.
- Davison, B.H., Drescher, S.R., Tuskan, G.A., Davis, M.F. & Nghiem, N.P., 2006. Variation of S/G ratio and lignin content in a *Populus* family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 130: 427-435
- de Souza, A.P., Leite, D.C.C., Pattathil, S., Hahn, M.G. & Buckeridge, M.S., 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenerg. Res.*, 6: 564-579
- del Rio, J.C., Prinsen, P., Rencoret, J., Nieto, L., Jimenez-Barbero, J., Ralph, J., Martinez, A.T. & Gutierrez, A., 2012. Structural characterization of the lignin in the cortex and pith of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) stems. *J. Agric. Food Chem.*, 60: 3619-3634
- DeMartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H.J., Hahn, M.G. & Wyman, C.E., 2013. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. *Energy Environ. Sci.*, 6: 898-909
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D.J. & Parvathi, K., 2001. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry*, 57: 1069-1084
- Fan, L., Linker, R., Gepstein, S., Tanimoto, E., Yamamoto, R. & Neumann P.M., 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiol.*, 140: 603-612
- Fu, C., Mielenz, J.R., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C.Y., Rodriguez, M.Jr., Chen, F., Foston, M., Ragauskas, A., Bouton, J., Dixon, R.A. & Wang, Z-Y., 2011. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 3803-3808
- Ghannoum, O., 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Ann. Bot.*, 103: 635-644.

- Hatfield, R. & Fukushima, R., 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.*, 45: 832-839
- He, L. & Terashima, N., 1990. Formation and structure of lignin in monocotyledons. III. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum*) lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions. *J. Wood Chem. Technol.*, 10: 435-459
- He, L. & Terashima, N., 1991. Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. *Holzforschung*, 45: 191-198
- Himmel, M.E., Ding, S-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. & Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315: 804-807
- Inman-Bamber, N.G., 2004. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Res.*, 89: 107-122
- Inman-Bamber, N.G., Bonnett, G.D., Spillman, M.F., Hewitt, M.L. & Jackson, J., 2008. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. *Aust. J. Agric. Res.*, 59: 13-26
- Inman-Bamber, N.G. & Smith, D.M., 2005. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Res.*, 92: 185-202
- Iskandar, H., Simpson, R., Casu, R., Bonnett, G., Maclean, D. & Manners, J., 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 325-337
- Iskandar, H.M., Casu, R.E., Fletcher, A.T., Schmidt, S., Xu, J., Maclean, D.J., Manners, J.M. & Bonnett, G.D., 2011. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BMC Plant Biol.*, 11: 12
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 523p
- Jung, J.H., Fouad, W.M., Vermerris, W., Gallo, M. & Altpeter, F., 2012. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnol. J.*, 10: 1067-1076

- Keating, J.D., Panganiban, C. & Mansfield, S.D., 2006. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 1196-1206
- Kiyota, E., Mazzafera, P. & Sawaya, A.C.H.F., 2012. Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database. *Anal. Chem.*, 84: 7015-7020
- Koch, K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 235-246
- Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 509-540
- Lange, B.M., Lapierre, C. & Sandermann, H., 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin - structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol.*, 108: 1277-1287
- Li, X., Weng, J-K. & Chapple, C., 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.*, 54: 569-581
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25: 402-408
- Machado, R.S., Ribeiro, R.V., Marchiori, P.E.R., Machado, D.F.S.P., Machado, E.C., Landell M.G.A., 2009. Biometric and physiological responses to water deficit in sugarcane at different phenological stages. *Pesq. Agrop. Bras.*, 44: 1575-1582
- Marita, J.M., Ralph, J., Hatfield, R.D. & Chapple, C., 1999. NMR characterization of lignins in *Arabidopsis* altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12328-12332
- Marques, F., 2009. O alvo é o bagaço - subproduto abundante da indústria da cana dá vantagem competitiva ao Brasil na busca do etanol de segunda geração. *Pesq. FAPESP*, 163: 16-20
- Masarin, F., Gurpilhares, D.B., Baffa, D.C.F., Barbosa, M.H.P., Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol. Biofuels*, 4: 55
- Moore, P.H., 1987. Anatomy and morphology. IN: Sugar cane improvement through breeding (D.J. Heinz, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 85-142

- Morreel, K., Dima, O., Kim, H., Lu, F., Niculaes, C., Vanholme, R., Dauwe, R., Goeminne, G., Inze, D., Messens, E., Ralph, J. & Boerjan, W., 2010. Mass spectrometry-based sequencing of lignin oligomers. *Plant Physiol.*, 153: 1464-1478
- Morreel, K., Ralph, J., Kim, H., Lu, F.C., Goeminne, G., Ralph, S., Messens, E. & Boerjan, W., 2004. Profiling of oligolignols reveals monolignol coupling conditions in lignifying poplar xylem. *Plant Physiol.*, 136: 3537-3549
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, J.D.F., Dornelas, M.C. & Mazzafera, P., 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.*, 52: 360-376
- Nakashima, J., Chen, F., Jackson, L., Shadle, G., Dixon, R.A., 2008. Multi-site genetic modification of monolignol biosynthesis in alfalfa (*Medicago sativa*): effects on lignin composition in specific cell types. *New Phytol.*, 179: 738-750
- Pan, Y.Q., Luo, H.L. & Li, Y.R., 2009. Soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase: Key enzymes in regulating sucrose accumulation in sugarcane stalk. *Sugar Tech* 11: 28-33
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P. & Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Biores. Technol.*, 74: 69-80
- Papini-Terzi, F.S., Rocha, F.R., Vencio, R.Z.N., Felix, J.M., Branco, D.S., Waclawovsky, A.J., Del Bem, L.E.V., Lembke, C.G., Costa, M.D.L., Nishiyama, M.Y.Jr., Vicentini, R., Vincentz, M.G.A., Ulian, E.C., Menossi, M. & Souza, G.M., 2009. Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics*, 10: 120
- Queiroz, R.J.B., Santos, D.M.M., Ferraudo, A.S., Carlin, S.D. & Silva, M.D., 2011. Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. *Sci. Agric.*, 68: 469-476
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H. & Boerjan, W., 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.*, 3: 29-60
- Ramesh, P., 2000. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *J. Agron. Crop Sci.*, 185: 83-89
- Ribeiro, R.V., Machado, R.S., Machado, E.C., Machado, D.F.S.P., Magalhães Filho, J.R. & Landell, M.G.A., 2013. Revealing drought-resistance and productive patterns in

- sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. *Exp. Agric.*, 49: 212-224
- Robertson, M.J., Inman-Bamber, N.G., Muchow, R.C. & Wood, A.W., 1999. Physiology and productivity of sugarcane with early and mid-season water deficit. *Field Crops Res.*, 64: 211-227
- Rogers, L.A. & Campbell, M.M., 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytol.*, 164: 17-30
- Rose, S. & Botha, F.C., 2000. Distribution patterns of neutral invertase and sugar content in sugarcane internodal tissues. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 819-824
- Siqueira, G., Milagres, A.M.F., Carvalho, W., Koch, G. & Ferraz, A., 2011. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnol. Biofuels*, 4: 7
- Smeekens, S., 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 49-81
- Smit, M.A. & Singels, A., 2006. The response of sugarcane canopy development to water stress. *Field Crops Res.*, 98: 91-97
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W., 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.*, 153: 895-905
- Vanholme, R., Morreel, K., Darrah, C., Oyarce, P., Grabber, J.H., Ralph, J. & Boerjan, W., 2012. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol.*, 196: 978-1000
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W., 2008. Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 278-285
- Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L. & Zivy, M., 2005. Water deficits affect caffeate *O*-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol.*, 137: 949-960
- Voelker, S.L., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C., Kitin, P. & Strauss, S.H., 2011. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant Cell Environ.*, 34: 655-668
- Walsh, K.B., Sky, R.C. & Brown, S.M., 2005. The anatomy of the pathway of sucrose unloading within the sugarcane stalk. *Funct. Plant Biol.*, 32: 367-374

- Yang, L., Wang, C.C., Guo, W.D., Li, X.B., Lu, M. & Yu, C.L., 2006. Differential expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under water deficit. *Russian J. Plant Physiol.*, 53: 390-395
- Yoshimura, K., Masuda, A., Kuwano, M., Yokota, A. & Akashi, K., 2008. Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C₃ xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiol.*, 49: 226-241
- Zhang, J.X., Nguyen, H.T. & Blum, A., 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.*, 50: 291-302

CAPÍTULO 2

**DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM DOIS
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
CRESCIDOS SOB BAIXA TEMPERATURA**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Analisar o efeito da temperatura sobre a deposição de lignina no caule em dois genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para o teor de lignina, IACSP04-627 (8,12 %, alto teor) e IACSP04-065 (4,32 %, baixo teor), determinando o teor de lignina em diferentes regiões do colmo (córtex jovem, medula jovem, córtex maduro e medula madura).
- 2 – Caracterizar o padrão de expressão dos genes da via de biossíntese de monolignóis, em diferentes regiões do colmo, em plantas de cana-de-açúcar submetidas à baixa temperatura.
- 3 – Identificar possíveis genes-alvo relacionados à regulação do teor e/ou composição da lignina na cana com potencial para manipulação genética.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C4 com alta eficiência na produção de biomassa. No Brasil, a cana é empregada na produção de açúcar e etanol e, segundo as estimativas, a safra 2013/2014 deve atingir 660 milhões de toneladas, um aumento de cerca de 12 % em relação à safra passada (CONAB, 2013). O desenvolvimento tecnológico do setor, iniciado na década de 1970 com a implantação do programa Pró-Álcool, elevou a indústria brasileira a um patamar de excelência e tornou a produção de etanol a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar significativamente mais eficiente que a produção advinda de outras fontes tais como milho, beterraba e palha de milho (Goldemberg *et al.*, 2008). Apesar da eficiência do sistema, acredita-se que as atuais variedades de cana-de-açúcar estejam próximas de atingir um limite natural da capacidade de armazenamento de sacarose devido principalmente à estreita base genética, restringindo os avanços obtidos pelas técnicas de melhoramento convencional (Grof & Campbell, 2001).

Os resíduos industriais da cana (bagaço e palha) representam dois terços do total de açúcares estocados pela planta, localizados nas paredes celulares do caule e das folhas na forma dos carboidratos estruturais (Soccol *et al.*, 2010). A energia armazenada nos carboidratos constituintes da parede celular (celulose e hemicelulose) apresenta alto potencial para a geração de etanol celulósico obtido a partir da conversão da biomassa da cana. Estima-se que 92 % do bagaço sejam utilizados para produzir calor, mantendo a auto-suficiência energética das usinas produtoras de açúcar e etanol (Macedo, 2005). Segundo Macedo (2005), se apenas os 8 % restantes do bagaço da cana fossem convertidos em etanol, haveria um adicional de 2200 L de etanol por hectare, elevando a produtividade para 8200 L/hectare e promovendo uma redução de 29 % na área plantada.

A demanda atual por fontes de energia renovável em substituição aos combustíveis fósseis tem impulsionado as pesquisas na área e, neste sentido, a biomassa lignocelulósica tem sido considerada uma promissora fonte para a produção de biocombustíveis. A utilização do material lignocelulósico envolve o pré-tratamento da biomassa visando à desestruturação das paredes celulares, a liberação de açúcares fermentáveis (sacarificação) e, finalmente, a fermentação desses açúcares para obtenção de bioetanol (Himmel *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008). Os principais constituintes da biomassa lignocelulósica são a celulose, a hemicelulose e a lignina, com proporções relativas dos três componentes variando de acordo com a origem do material (Reddy & Yang, 2005). A lignina é um dos principais fatores ligados à recalcitrância da biomassa vegetal, constituindo uma importante limitação ao aproveitamento dos açúcares estruturais para a conversão em bioetanol e outros biomateriais.

Na cana-de-açúcar, o bagaço é constituído por aproximadamente 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina (Pandey *et al.*, 2000). Ao longo do desenvolvimento do caule, apenas os elementos do protoxilema são lignificados no entrenó do ápice (imaturo) e, a seguir, durante a alongação e maturação, a lignina vai sendo depositada no metaxilema e na porção interna da bainha de fibras que circundam os feixes vasculares. A lignificação progride com a maturação dos entrenós e, ao mesmo tempo em que a deposição de lignina intensifica o espessamento das células da bainha dos feixes, o parênquima de reserva começa a ser lignificado, o que coincide com o aumento do armazenamento de sacarose nos entrenós maduros (Jacobsen *et al.*, 1992). Posteriormente, a epiderme e a hipoderme também se tornam lignificadas. Padrão similar de lignificação tem sido observado em outras espécies de monocotiledôneas forrageiras como *Festuca arundinacea* Schreb (Chen *et al.*, 2002) e milho (Jung & Casler, 2006).

A lignina desempenha funções vitais durante o crescimento e desenvolvimento das plantas porque possibilita o transporte de água através dos elementos traqueais do xilema, aumenta a resistência e rigidez das paredes celulares e, além disso, atua como uma barreira natural ao ataque de insetos e patógenos (Iiyama *et al.*, 1994). Além de restringir a eficiência de sacarificação da celulose pelas enzimas hidrolíticas (Siqueira *et al.*, 2011; DeMartini *et al.*, 2013), a lignina também está relacionada à eficiência de polpação da madeira (O'Connell *et al.*, 2002) e à digestibilidade das forrageiras (Reddy *et al.*, 2005). Diversos estudos utilizando plantas transgênicas e mutantes para diferentes genes da via de biossíntese de lignina têm demonstrado que conteúdo e composição podem influenciar na degradabilidade da parede celular, impactando negativamente vários processos industriais (Piquemal *et al.*, 2002; Barriere *et al.*, 2004; Chen & Dixon, 2007; Li *et al.*, 2008).

De fato, resultados obtidos por Chen & Dixon (2007) mostraram que a lignina é provavelmente o maior fator relacionado à recalcitrância das paredes celulares à sacarificação, especialmente durante a hidrólise enzimática. Estes autores mostraram que a recalcitrância ao pré-tratamento ácido e à hidrólise enzimática foi diretamente proporcional aos teores de lignina em linhagens de alfalfa transgênicas independentemente reprimidas para diferentes genes da via de biossíntese de lignina. Plantas de milho silenciadas para o gene ácido caféico *O*-metiltransferase (*COMT-AS*) exibiram redução de 15 % a 30 % da atividade de *COMT* e significativa alteração do conteúdo e composição da lignina, além de melhorar a digestibilidade *in vitro* das plantas (Piquemal *et al.*, 2002). Similarmente, mutantes *brown midrib* de milho (*bm*) têm sido caracterizados pelo fenótipo de coloração marrom avermelhado associado a tecidos lignificados e por exibirem alteração da composição e/ou do conteúdo de lignina. A redução do conteúdo de lignina no mutante *bm3* de milho (cerca de 20 % da lignina Klason em relação às plantas selvagens) que possui atividade diminuída de *COMT* parece

explicar a maior digestibilidade das paredes celulares das plantas mutantes *in vitro* e *in vivo* (Keith *et al.*, 1979; Barriere *et al.*, 2004).

Os materiais comerciais de cana-de-açúcar usualmente contêm altos níveis de lignina. Masarin *et al.* (2011) analisaram a influência do conteúdo de lignina sobre a digestibilidade do bagaço em 11 clones de cana e concluíram que a hidrólise enzimática da celulose foi mais eficaz nos clones com menor teor de lignina. Os autores demonstraram que amostras de bagaço submetidas diretamente à digestão com celulases comerciais atingiram até 31 % de glicose após 72 h, enquanto amostras quimicamente deslignificadas alcançaram mais de 80 % de eficiência de conversão de celulose durante o tratamento enzimático. Outro estudo encontrou que a conversão de celulose a partir de amostras da medula não-tratada foi três vezes mais eficiente do que nas amostras de córtex não-tratado (Siqueira *et al.*, 2011). Conforme indicado por esses resultados, o menor grau de lignificação das células do parênquima, abundantes na região da medula, foram significativamente menos recalcitrantes do que as fibras e vasos que predominam no córtex. Neste sentido, Rezende *et al.* (2011) mostraram a relação positiva entre o uso de pré-tratamento para remoção de hemiceluloses e lignina e o aumento da eficiência da hidrólise enzimática da celulose contida na biomassa do bagaço da cana.

A deposição de lignina nas paredes celulares é um processo espacial e temporalmente regulado que varia amplamente entre espécies, mas também entre diferentes partes da planta, tecidos e tipos celulares (Grabber *et al.*, 2004). A lignina é um heteropolímero composto por três alcoóis *p*-hidroxicinamil (monolignóis) denominados álcool *p*-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil, que ao serem incorporados ao polímero formam as unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Boerjan *et al.*, 2003). Os monolignóis são incorporados em diferentes estágios da formação da parede celular. Durante o início da

lignificação nas angiospermas, álcool coniferil e pequenas quantidades de álcool *p*-cumaril são co-polimerizados na parede celular primária originando um polímero constituído por unidades G e H. Nos estágios finais de diferenciação da parede celular secundária, álcool coniferil e quantidades crescentes de álcool sinapil são incorporados, resultando em ligninas compostas por unidades G e S (Grabber, 2005). Em gramíneas, significativas quantidades de ésteres hidroxicinâmicos e outros compostos fenilpropanóides são adicionados ao polímero de lignina (Ralph, 2010). Conteúdo e composição (razão S/G) da lignina são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento do caule na cana-de-açúcar e também entre as duas regiões anatomicamente distintas do entrenó (córtex e medula) (Bottcher *et al.*, 2013).

A cana-de-açúcar é uma planta tipicamente cultivada em áreas tropicais e subtropicais, onde as temperaturas ótimas para crescimento estão entre 25°-35°C. De acordo com Moore (1987), temperaturas próximas a 20°C podem comprometer o crescimento normal da cana, enquanto temperaturas em torno de 15°C são suficientes para causar injúrias nos tecidos da planta. Tais consequências negativas podem ser explicadas pela ausência de estratégias eficientes de resistência ao frio, fato principalmente relacionado à base genética dos modernos cultivares de cana que deriva em grande parte de *Saccharum officinarum*, uma espécie que embora tenha contribuído para maximizar os ganhos em acúmulo de sacarose, é sensível a baixas temperaturas (Khan *et al.*, 2013). Apesar da cana apresentar baixa resistência ao frio, algumas evidências apontam que as variedades podem diferir quanto à sensibilidade ao frio (Du *et al.*, 1999).

Diversos estudos têm reportado os efeitos das baixas temperaturas sobre a biossíntese de diferentes componentes da parede celular. Alterações na expressão de genes e/ou atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de polissacarídeos da parede celular durante a aclimação ao frio foram observadas em espécies como trigo (Zabotin *et al.*, 1998) e

Arabidopsis (Qu *et al.*, 2011). O metabolismo de compostos fenólicos também é afetado pelo frio. O maior acúmulo de compostos fenólicos em resposta ao frio foi positivamente correlacionado à maior atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas de *Brassica napus* (Solecka & Kacperska, 1995). Os conteúdos de lignina e compostos fenólicos solúveis foram diferencialmente alterados em diferentes órgãos de plantas de trigo crescidas sob baixas temperaturas, enquanto a atividade de PAL foi sempre reduzida em resposta ao frio (Olenichenko & Zagoskina, 2005). De acordo com os autores, o aumento do nível de compostos fenólicos constatado nas folhas poderia ter uma função protetora contra o estresse oxidativo gerado durante o estresse de frio.

Ford *et al.* (1979) avaliaram os efeitos da temperatura sobre o metabolismo da parede celular em espécies de gramíneas tropicais e de clima temperado. À exceção da quantidade de celulose que foi diminuída com o aumento da temperatura entre as gramíneas tropicais, temperaturas mais elevadas induziram o aumento dos conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina em ambos os grupos de plantas. Os autores também encontraram uma correlação negativa entre o conteúdo de lignina e a digestibilidade *in vitro* no grupo tropical, o que não foi verificado para o grupo temperado. O significativo aumento nas atividades das enzimas PAL e CAD foi correlacionado à maior tolerância a baixas temperaturas observada em clones de *Miscanthus* sp. durante a aclimação ao frio (Domon *et al.*, 2013). Em mesocótilos de milho, o aumento da atividade de duas peroxidases de parede celular e o maior conteúdo de lignina durante a aclimação das plantas ao frio foi relacionado a mecanismos de tolerância, que poderiam estar envolvidos na preservação da integridade celular em resposta às injúrias causadas pelas baixas temperaturas (Anderson *et al.*, 1995).

Até o momento, não há registro de outros estudos mostrando os efeitos do estresse de frio sobre o processo de lignificação em cana-de-açúcar e sua influência sobre o conteúdo e/ou

composição da lignina. Tendo em vista a importância do bagaço da cana como fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis, o presente trabalho investigou a influência da temperaturas sobre a deposição de lignina no caule em dois genótipos de cana com diferentes conteúdos de NDF (fibra em detergente neutro). Nossos resultados apontaram que, sob condições experimentais, os genótipos de cana apresentaram diferentes graus de sensibilidade à variação de temperatura e a deposição de lignina no caule foi diferencialmente afetada entre esses genótipos durante a aclimação ao frio. Possíveis implicações para a fisiologia da planta e para a qualidade do bagaço são discutidas.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. *Material vegetal e desenho experimental*

Dois genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), IACSP04-627 e IACSP04-065, derivados de uma população sob seleção para uso como planta forrageira foram investigadas neste estudo. Análises prévias de NDF (fibra em detergente neutro) realizadas pelo Centro de Cana do Instituto Agronômico (Ribeirão Preto, Brasil) indicaram que os teores de lignina nos genótipos IACSP04-627 e IACSP04-065 foram 8,12 % e 4,32 %, respectivamente. Segundo Landell *et al.* (dados não publicados), o teor de lignina obtido a partir de 66 genótipos de cana forrageira variou de 4,3 % a 8,6 % e, desse modo, IACSP04-627 foi considerada com alto teor de lignina e IACSP04-065 com baixo teor de lignina.

Vinte plantas (10 por genótipo) propagadas a partir de gemas laterais (fev/2010) foram produzidas na casa de vegetação do Instituto de Biologia utilizando plantas matrizes fornecidas pelo Centro de Cana do Instituto Agronômico, Ribeirão Preto, Brasil. As plantas foram cultivadas em vasos de 20 L (uma planta por vaso) contendo substrato comercial, por cerca de quatro meses até a aplicação dos tratamentos. As brotações secundárias (perfilhos) eram retiradas periodicamente, de modo a preservar apenas o colmo principal no vaso. Durante esse período, as plantas permaneceram sob regime normal de irrigação.

Plantas de cana-de-açúcar com 110 dias após o plantio (DAP) foram divididas em dois grupos, sendo que um deles permaneceu exposto à temperatura ambiente ou ‘ambiente frio’, (frio) e o outro grupo foi mantido em uma câmara com temperatura controlada ou ‘ambiente quente’ (quente) localizada no interior da casa de vegetação (fig. 1). Essa câmara foi revestida com plástico filme agrícola transparente e equipada com um aquecedor que elevava a temperatura interna em cerca de 8,3°C no período entre 17:00-9:00 h. Desta forma, as plantas crescidas no ‘ambiente frio’ permaneciam constantemente expostas à temperatura ambiente,

incluindo as baixas temperaturas noturnas, enquanto as plantas do ‘ambiente quente’ não eram submetidas ao frio noturno.

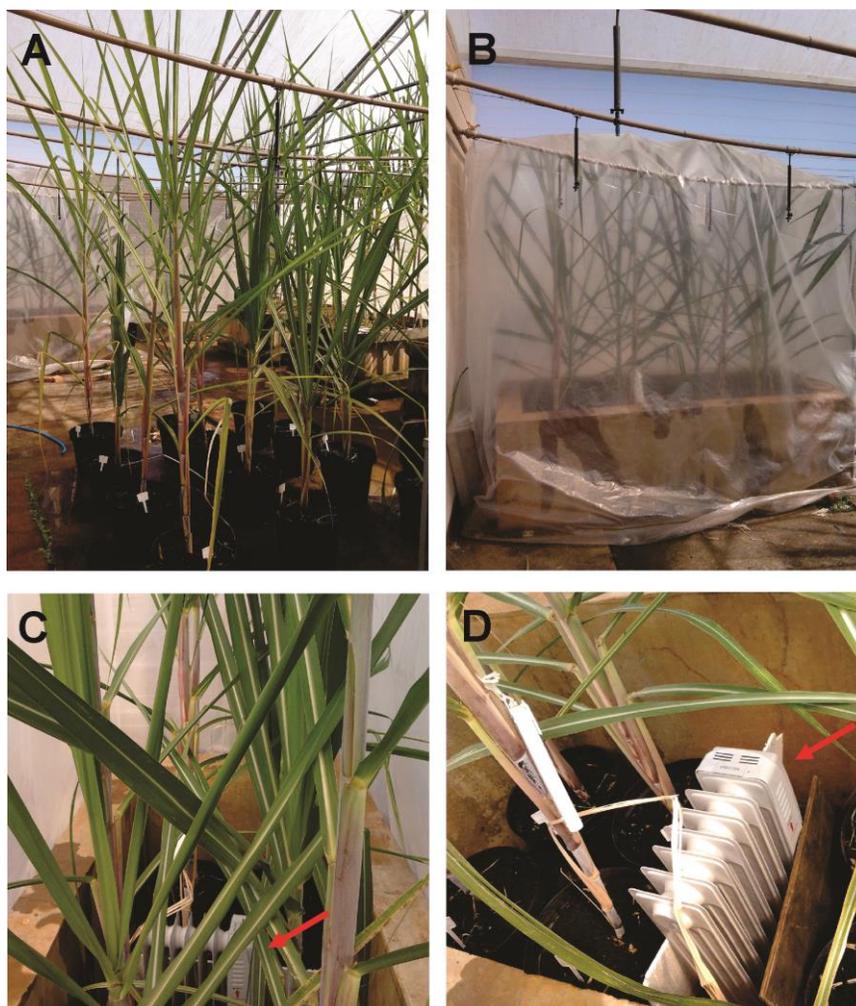


Figura 1. Plantas de cana-de-açúcar crescendo em duas condições distintas de temperatura. A- vista geral da área na estufa onde as plantas cresceram expostas às baixas temperaturas noturnas (ambiente frio); B- Câmara de alvenaria com temperatura noturna controlada (ambiente quente); C- Detalhe das plantas no interior da câmara; D- Aquecedor (seta vermelha).

O experimento foi conduzido por 75 dias, entre 20/05/10 a 03/08/2010 (fig. 2). A temperatura diária média dentro da câmara permaneceu em torno de 26,5°C e, na área externa à câmara, foi em média 14,5°C. Ao final do experimento, o caule foi numerado do ápice em direção à base, e o entrenó um (E1) foi identificado como o entrenó no qual a folha +1 estava

inserida. Os entrenós foram separados de acordo com o seu grau de maturação: entrenó jovem (*young*) = *pool* E1-E3 e entrenó maduro (*mature*) = E11. Cada uma dessas amostras foi separada em córtex (*rind*) e medula (*pith*). Durante a coleta, todo o material foi mantido em nitrogênio líquido e, posteriormente, ele foi dividido em duas partes: o material utilizado nas análises bioquímicas foi liofilizado a -60°C por 72 h e o material usado nas análises moleculares foi armazenado a -80°C até o processamento.

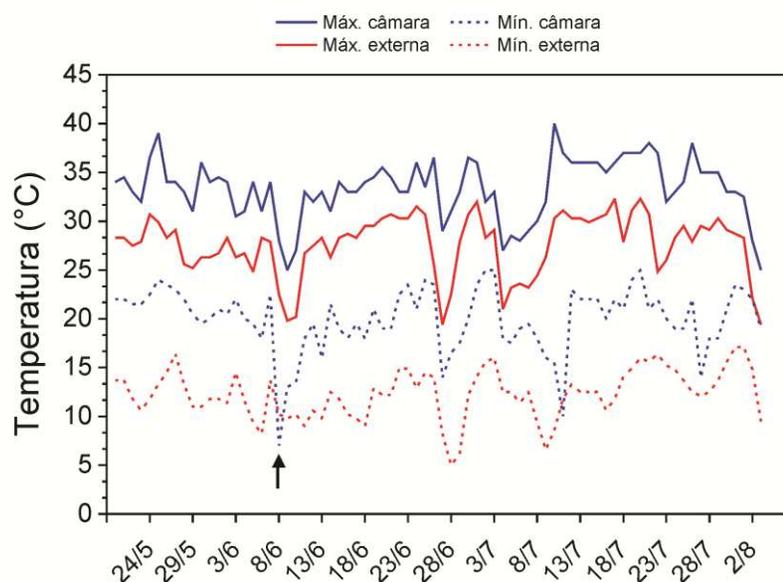


Figura 2. Monitoramento das temperaturas máximas e mínimas no interior da câmara de alvenaria (plantas com temperatura noturna controlada, ‘ambiente quente’) e externo à câmara (plantas sem controle de temperatura noturna, ‘ambiente frio’). A seta indica a brusca queda de temperatura na câmara devido ao desligamento do aquecedor.

2.2. Dados biométricos

Ao término do experimento, foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento das plantas: número de folhas verdes, número de entrenós do caule, comprimento do caule, diâmetro mediano dos entrenós, massa fresca do caule, massa seca das folhas e massa seca das raízes. Para contagem do número de folhas foram consideradas apenas as

folhas com > 50 % da lâmina foliar com coloração verde. O diâmetro dos entrenós do caule foi medido com paquímetro digital. Medidas de massa seca foram determinadas após secagem do material em estufa a 72°C por 72 h.

2.3. Determinação de sacarose, glicose e frutose

Cerca de 30 mg de material (medula) liofilizado e triturado foi extraído duas vezes com 1 mL de 80 % etanol em banho úmido a 40°C por 30 min. Após centrifugação, 750 µL do sobrenadante em cada extração foi coletado, misturado e estocado a 4°C. Posteriormente, os extratos foram secos em concentrador SpeedVac (Savant) e o resíduo foi solubilizado em 1 mL de água milli-Q. Cada amostra (50 µL) foi diluída em 80 % acetonitrila em água (950 µL) e uma alíquota de 4 µL foi injetada no espectrômetro de massas Acquity UPLC-MS (Micromass-Waters, Manchester, England) acoplado a um TDQ triplo-quadrupolo. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Acquity UPLC C18-BEH (2,1 mm x 50 mm, 1,7µm) utilizando um gradiente de eluição de 20 % a 35 % de uma solução aquosa de 0,1 % NH₄OH (solvente B) durante 6 min, usando acetonitrila contendo 0,1 % NH₄OH como solvente A. Foi utilizado um fluxo de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna de 30°C. A fonte de ionização foi *electrospray* no modo negativo de acordo com seguintes parâmetros: capilar 3,0 kV, cone 30 V, temperatura na fonte de ionização de 150°C e temperatura de dessolvatação de 350°C. O teor dos açúcares foi estimado a partir de curvas de calibração geradas por padrões comerciais de glicose, frutose e sacarose (5 a 100 µg/mL).

2.4. Análises qualitativa e quantitativa da lignina

2.4.1. Análise morfo-anatômica

Secções transversais da região mediana do terceiro (E3 ou E4) e do décimo primeiro (E11) entrenós do caule de plantas cultivadas sob condições padrões foram manualmente

obtidas. As secções foram dispostas em lâminas de vidro e submetidas a reação com floroglucinol (Johansen, 1940). O material foi tratado por 5 min com solução 1 % floroglucinol em 95 % etanol e montadas em 25 % HCl. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX51) e as imagens capturadas com uma câmera Olympus DP71 acoplada ao equipamento.

2.4.2. Determinação do conteúdo de lignina

Extração: aproximadamente 100 mg de material liofilizado e triturado (medula e córtex) foi homogeneizado em 1 mL de 80 % etanol e extraído em banho de ultrassom por 30 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado, evaporado em concentrador SpeedVac (Savant) e reservado para a determinação do perfil de ligninas solúveis. A fração sólida (restos celulares) foi lavada três vezes consecutivas com 1,5 mL de 80 % etanol. Os sobrenadantes foram descartados após cada centrifugação para a completa retirada dos extrativos. O resíduo álcool insolúvel (alcohol-insoluble residue, AIR) foi lavado com água Milli-Q, seco a 65°C por 24 h e, posteriormente, usado na quantificação das ligninas com ácido tioglicólico.

Perfil de ligninas solúveis: o precipitado obtido na primeira fase da extração foi dissolvido em 0,5 mL de água Milli-Q e as ligninas foram extraídas com 0,6 mL de acetato de etila. A fase superior (orgânica) contendo as ligninas solúveis foi coletada, seca com N₂ e o resíduo resultante foi solubilizado em solução aquosa contendo 35 % acetonitrila. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas Acquity UPLC-MS (Micromass-Waters, Manchester, England) acoplado a um TDQ triplo-quadrupolo e os parâmetros foram usados como descritos por Kiyota *et al.* (2012). A separação cromatográfica utilizou uma coluna C18-BEH (2,1 mm × 50 mm, 1,7 µm) e a eluição dos compostos utilizou um gradiente de 5 % a 100 % acetonitrila (solvente B) e uma solução aquosa com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A),

com fluxo de 0,2 mL/min. A identificação dos precursores das ligninas (monômeros e oligômeros) foi realizada por comparação com dados de uma biblioteca de estruturas de ligninas sintéticas produzidas por nosso laboratório (Kiyota *et al.*, 2012). A identificação foi baseada em parâmetros como o tempo de retenção, a razão massa-carga (m/z) e o padrão de fragmentação *MS/MS* dos compostos.

Quantificação da lignina: a determinação do conteúdo de lignina nas amostras utilizou 15 mg de AIR e foi estimado pelo método de derivatização com ácido tioglicólico (Lange *et al.*, 1995). Após a extração, o pellet (coloração amarelo-amarronzado) foi seco e, a seguir, solubilizado em 1 mL de 0,5 M NaOH. As amostras foram diluídas (10 a 40x) em 0,5 M NaOH e as absorvâncias lidas em 280 nm. A quantificação da lignina foi baseada em uma curva de calibração (2 a 100 μ g) gerada por um padrão comercial (Lignin alkali, 2-hydroxypropyl ether, Sigma Aldrich).

2.5. Análise de expressão gênica

2.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Material congelado foi triturado em N₂ líquido até a obtenção de um fino pó. Cerca de 200-300 mg de tecido pulverizado foi utilizado na extração de RNA total de acordo com o método CTAB (Chang *et al.*, 1993). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro em 260 nm e a qualidade das amostras foi verificada em 1 % gel de agarose corado com brometo de etídio e pela razão A_{260}/A_{280} (pureza). A seguir, as amostras foram tratadas com Turbo DNase-free (Ambion) para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 μ g de RNA total usando Superscript™ III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme instruções do fabricante.

2.5.2. PCR quantitativo (qPCR)

A quantidade relativa de transcritos para 12 possíveis genes relacionados à biossíntese de lignina foi estimada em diferentes tecidos do caule de dois genótipos de cana-de-açúcar. Os genes estudados e seus primers estão listados na Tabela 1. A identificação destas sequências foi feita de acordo com Bottcher *et al.* (2013). As reações de qPCR foram preparadas com o kit QuantiFast™ SYBR Green PCR (Qiagen) em placas de 96 poços utilizando cDNA diluído 50x. As placas foram analisadas no sistema iCycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection (Bio-Rad). A correção dos valores de *Ct* (*Cycle threshold*) entre as placas de um mesmo ensaio (= gene) foi realizada a partir de uma amostra padrão por primer (inter-calibrador) comum entre as placas de cada ensaio, através de ferramenta disponível no software iQ5 (Bio-Rad) do equipamento. O cálculo da expressão relativa utilizou o método $\Delta\Delta C_T$ (Livak and Schmittgen, 2001) e *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) como gene de referência para normalizar os valores de expressão entre as amostras (Iskandar *et al.*, 2004; Bottcher *et al.*, 2013).

2.6. Estatística

O desenho experimental foi completamente randomizado, com quatro combinações de tratamento, constituindo um fatorial 2 x 2 (dois genótipos e dois regimes de temperatura), com quatro ou seis repetições. Os dados foram estatisticamente examinados usando análise de variância e testados para diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os genótipos e os regimes de temperatura usando o teste de Tukey e teste F. Todas as análises foram realizadas usando o software Statistica versão 10. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Para as análises bioquímicas e molecular, cada replicata representa a média de três determinações técnicas para cada amostra.

3. RESULTADOS

3.1. Dados biométricos

Plantas crescidas no ‘ambiente quente’ apresentaram valores similares para o número de folhas, o número de entrenós e a massa seca das raízes entre os dois genótipos de cana-de-açúcar. Comprimento e massa fresca do caule foram significativamente maiores em IACSP04-627 do que em IACSP04-065, enquanto a massa seca das folhas foi superior no último genótipo (tabela 1).

Tabela 1. Características morfológicas de dois genótipos de cana-de-açúcar crescidos no ambiente frio (frio) ou no ambiente quente (quente).

<i>Parâmetro</i>	IACSP04-627			IACSP04-065		
	Quente	Frio	Δ	Quente	Frio	Δ
<i>Número de folhas verdes</i>	12,5 ± 0,3 Aa	10,8 ± 0,5 Ba	-14	13,5 ± 1,0 Aa	9,8 ± 0,3 Ba	-27
<i>Número de entrenós</i>	15,8 ± 0,3 Aa	13,3 ± 0,5 Ba	-16	15,3 ± 0,6 Aa	11,8 ± 0,9 Ba	-23
<i>Comprimento do caule (m)</i>	1,64 ± 0,05 Aa	1,15 ± 0,04 Ba	-30	0,56 ± 0,03 Ab	0,24 ± 0,06 Bb	-57
<i>Massa fresca do caule (g)</i>	850,0 ± 43,6 Aa	569,2 ± 30,7 Ba	-33	515,0 ± 16,2 Ab	186,7 ± 60,5 Bb	-64
<i>Massa seca das folhas (g)</i>	114,2 ± 3,4 Ab	84,1 ± 3,2 Ba	-26	143,7 ± 3,3 Aa	98,0 ± 7,8 Ba	-32
<i>Massa seca das raízes (g)</i>	62,5 ± 2,3 Aa	68,6 ± 4,3 Aa	-	56,5 ± 7,8 Aa	60,3 ± 5,8 Aa	-

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre ambientes com temperaturas distintas dentro do mesmo genótipo (efeito do ambiente). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os genótipos dentro do mesmo ambiente (efeito do genótipo). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ($P \leq 0,05$). Cada valor representa a média ± erro padrão de quatro ou seis replicatas (n= 4 ou n=6).

À exceção da massa seca das raízes, o frio levou à redução significativa de todos os demais parâmetros de crescimento, em ambos os genótipos. As plantas com baixo teor de lignina foram mais negativamente afetadas pela baixa temperatura do que as plantas com alto teor de lignina, sendo que o comprimento e a massa fresca do caule exibiram as maiores taxas de redução, respectivamente 57 % e 64 % em IACSP04-065 e 29 % e 33 % em IACSP04-627 (tabela 1).

De modo geral, observou-se que o genótipo IACSP04-065 exibiu maior diâmetro dos entrenós ao longo de todo o caule (fig. 3), atingindo o máximo valor em E6 (38,9 mm). O frio também induziu nítidas reduções no diâmetro dos entrenós em ambos os genótipos de cana. Assim como nos demais parâmetros considerados, as plantas com baixo teor de lignina tenderam a ser mais sensíveis às baixas temperaturas comparativamente as plantas com alto teor de lignina, e enquanto em IACSP04-627 a redução é verificável apenas a partir de E10, em IACSP04-065 o efeito do frio pode ser observado ao longo de todo o caule (fig. 3).

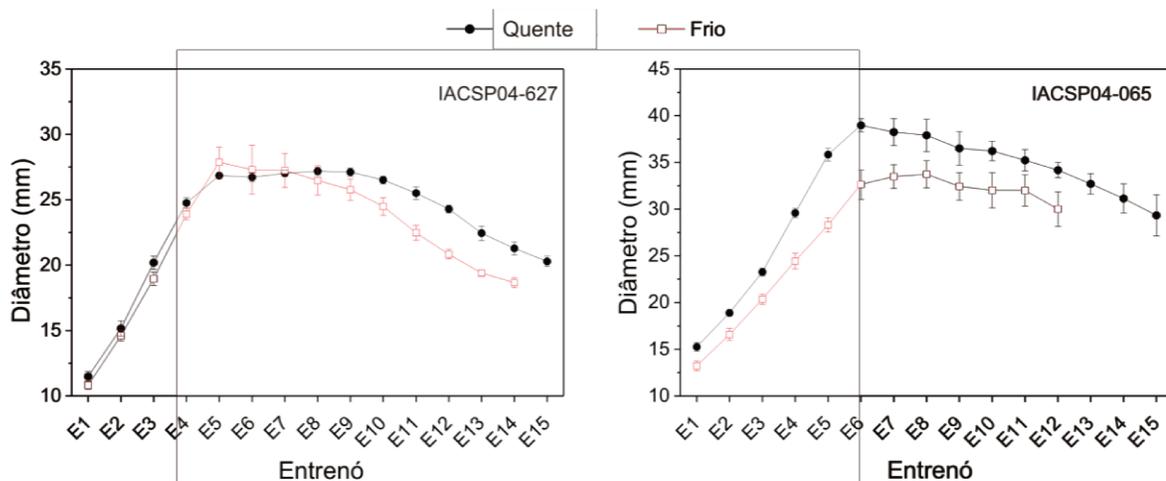


Figura 3. Diâmetro mediano dos entrenós do caule (E) em dois genótipos de cana-de-açúcar (IACSP04-627 e IACSP04-065) crescidos sob condições distintas de temperatura. Cada valor representa a média \pm erro padrão de quatro ou seis replicatas.

3.2. Sacarose e açúcares redutores

O teor de sacarose nos entrenós maduros foi aproximadamente 19 vezes maior em relação aos entrenós jovens (fig. 4A), atingindo 60 % da massa seca desse entrenó. Inversamente, os teores de glicose e frutose foram mais elevados nos entrenós jovens do que nos entrenós maduros do caule nas plantas crescidas na condição referência (fig. 4B e 4C). As quantidades de sacarose e açúcares redutores não variaram significativamente entre as plantas controle dos genótipos de cana-de-açúcar.

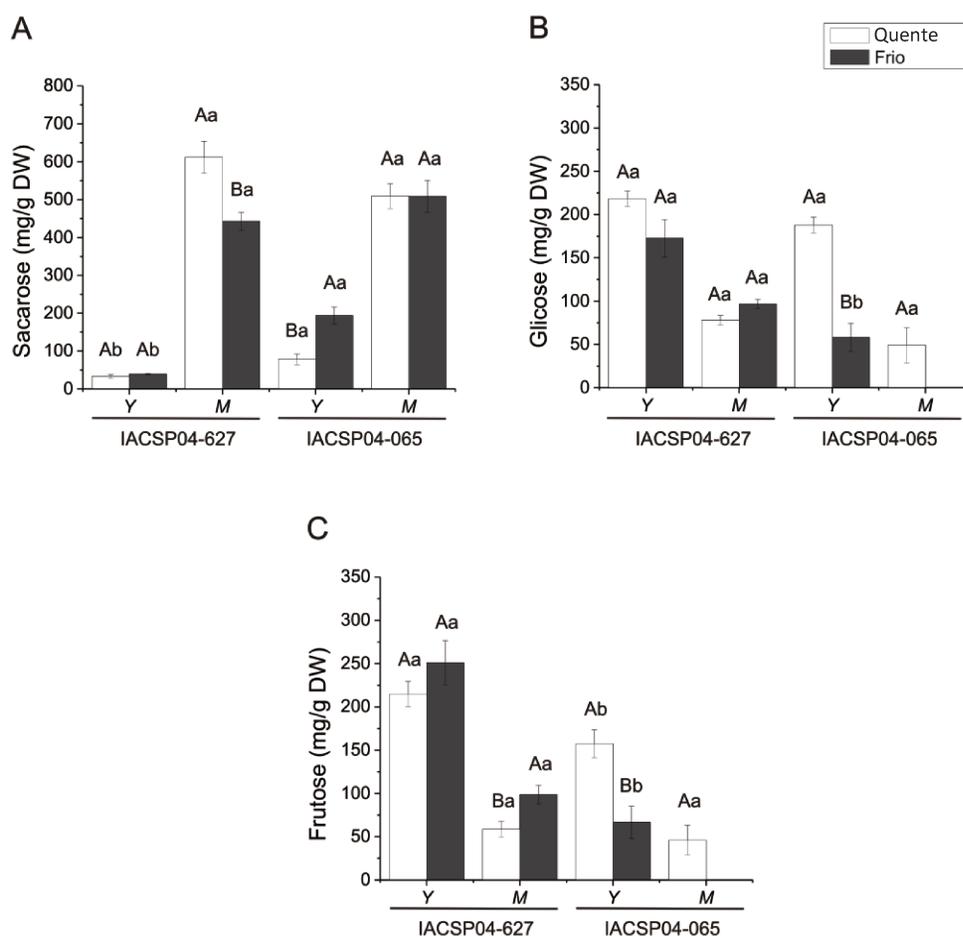


Figura 4. Efeito da temperatura sobre os teores de sacarose (A), glicose (B) e frutose (C) no entrenó jovem (*Young* = Y) e no entrenó maduro (*Mature* = M) em dois genótipos de cana-de-açúcar. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as duas condições de temperatura dentro do mesmo genótipo e as letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os genótipos dentro do mesmo ambiente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $P \leq 0,05$ (efeito da temperatura) e pelo Teste *F*, $P \leq 0,05$ (efeito do genótipo). Cada valor representa a média \pm erro padrão de quatro ou seis replicatas.

As baixas temperaturas induziram menor acúmulo de sacarose no entrenó maduro das plantas IACSP04-627, enquanto um significativo aumento foi verificado no entrenó jovem de IACSP04-065 (fig. 4A). As concentrações de glicose e frutose tenderam a ser reduzidas no entrenó jovem de IACSP04-065 sob condição de frio, o que não foi verificado em IACSP04-627, que aparentemente manteve os níveis de açúcares redutores similares aos das plantas referência (fig. 4B e 4C).

3.3. Análise qualitativa e quantitativa da lignina em cana

3.3.1. Caracterização morfo-anatômica

As análises histoquímicas com floroglucinol evidenciam que a deposição de lignina aumenta com a idade dos entrenós, isto é, entrenós da base do caule são mais lignificados que os entrenós do ápice. As secções dos entrenós da cana-de-açúcar mostram duas regiões morfológicamente distintas com diferentes graus de lignificação ao longo do caule (figs. 5 e 6). A região do córtex apresenta um grande número de feixes vasculares adensados próximos à epiderme e caracterizados por uma ampla bainha de esclerênquima (figs. 5F e 6F). Na região da medula dos entrenós os feixes vasculares encontram-se dispersos no tecido parenquimático.

Os genótipos de cana analisados nesse estudo apresentaram algumas diferenças no padrão de deposição de lignina ao longo do caule. Nos entrenós jovens, a epiderme e as células parenquimáticas distribuídas entre os feixes vasculares possuem parede delgada e não lignificada (figs. 5A, 5C, 6A e 6C). Em IACSP04-627, os elementos traqueais do protoxilema e do metaxilema além das fibras dos feixes vasculares do córtex e da medula do entrenó jovem mostravam-se em processo de diferenciação ou já diferenciados e lignificados (fig. 5A, 5E e 5G).

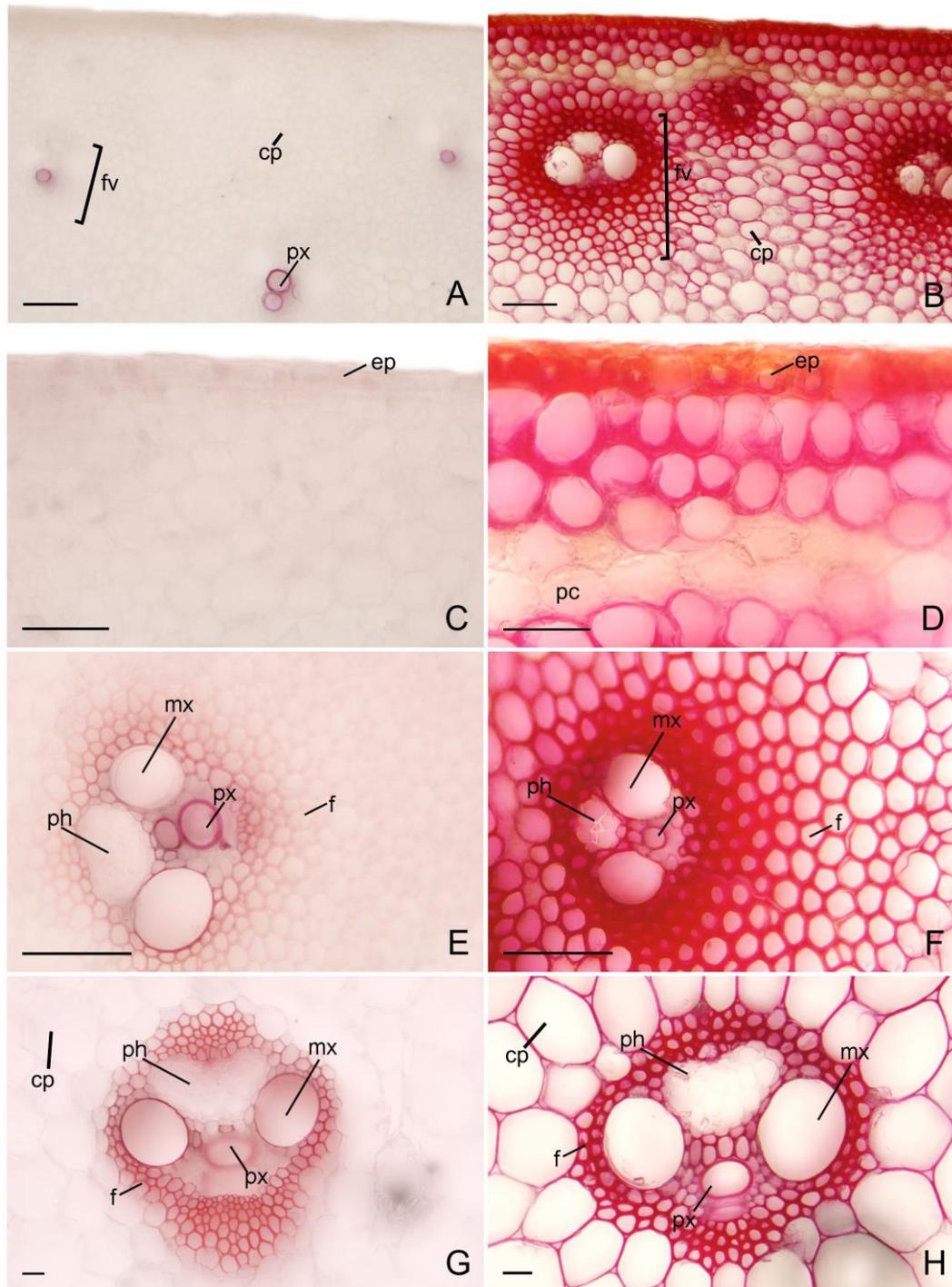


Figura 5. Secções transversais do caule da cana-de-açúcar (genótipo IACSP04-627) submetidas ao floroglucinol ácido para a detecção da lignina. Coluna da esquerda = entrenó jovem, Coluna da direita = entrenó maduro. A-B: região do córtex; C-D: detalhe da epiderme e camadas celulares adjacentes; E-F: detalhe do feixe vascular do córtex; G-H: detalhe do feixe vascular da medula. cp = célula parenquimática; ep = epiderme; f = fibras; mx = metaxilema; pc = parênquima clorofiliano; ph = floema; fv = feixe vascular; px = protoxilema. Barras: A-B; E-F = 50 μ m; C-D e G-H = 20 μ m.

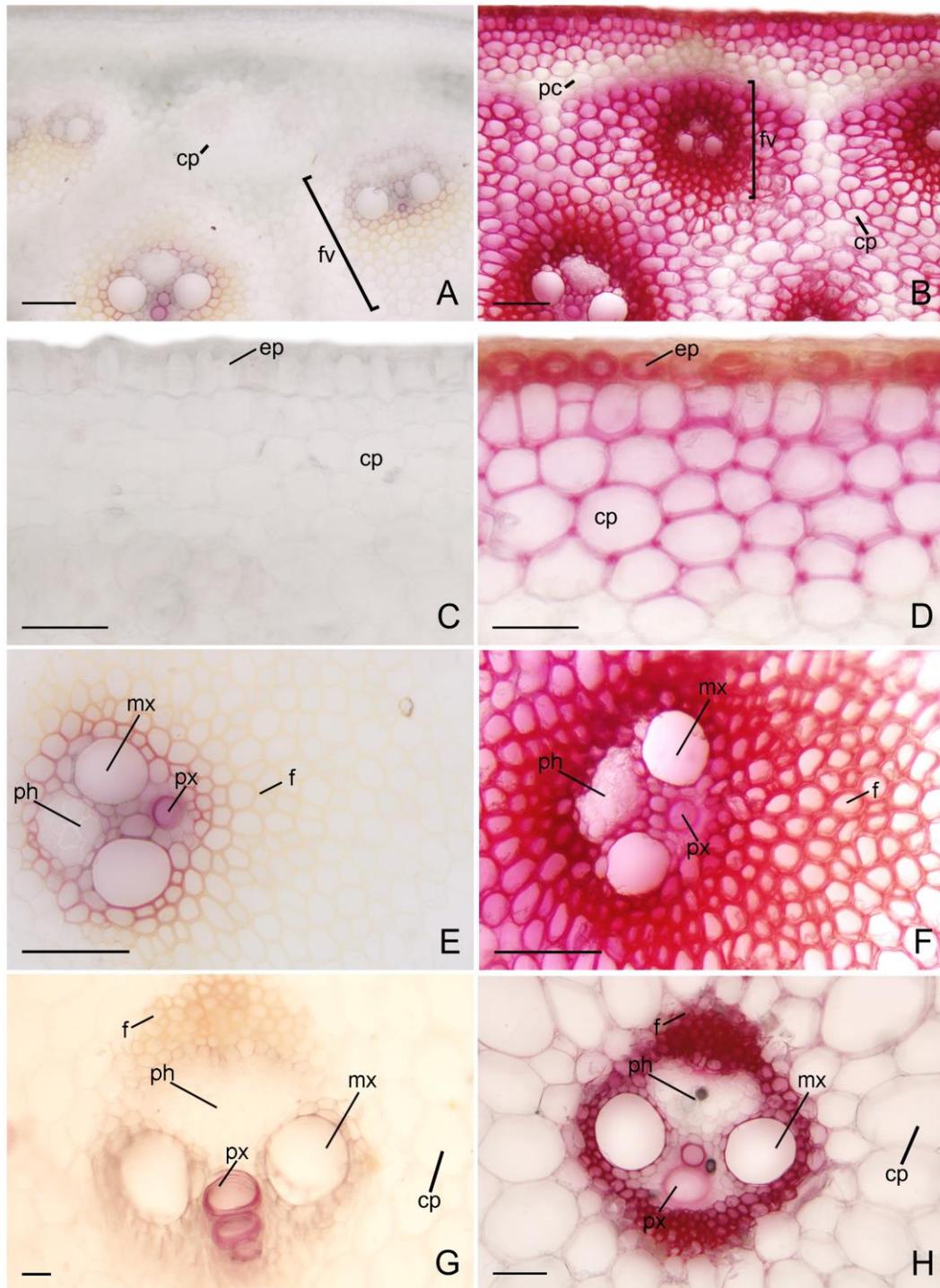


Figura 6. Secções transversais do caule da cana-de-açúcar (genótipo IACSP04-065) submetidas ao floroglucinol ácido para a detecção da lignina. Coluna da esquerda = entrenó jovem, Coluna da direita = entrenó maduro. A-B: região do córtex; C-D: detalhe da epiderme e camadas celulares adjacentes; E-F: detalhe do feixe vascular do córtex; G-H: detalhe do feixe vascular da medula. cp = célula parenquimática; ep = epiderme; f = fibras; mx = metaxilema; pc = parênquima clorofiliano; ph = floema; fv = feixe vascular; px = protoxilema. Barras: A-B; E-F = 50 μ m; C-D e G-H = 20 μ m.

De forma semelhante, nas plantas IACSP04-065, observou-se que os vasos do protoxilema do entrenó jovem apresentam-se lignificados no córtex e na medula (fig. 6E e 6G). Adicionalmente, o metaxilema e as fibras do esclerênquima também se mostram em início de lignificação apenas no córtex (fig. 6E). Nos entrenós maduros, a lignificação pode ser observada nas células epidérmicas que exibem uma parede espessada e recoberta por cutícula, nas células parenquimáticas, nos elementos traqueais do protoxilema e metaxilema e nas fibras da bainha do feixe vascular em ambos os genótipos. No entrenó maduro de IACSP04-627, as células parenquimáticas da medula exibiram forte reação na presença do floroglucinol-HCl (fig. 5H), o que não foi observado em IACSP04-065 (fig. 6H).

3.3.2. Perfil de ligninas solúveis

Os monômeros e oligômeros de lignina foram identificados de acordo com o tempo retenção dos picos cromatográficos, o m/z e o espectro MS/MS e comparados com nossa DIY biblioteca, conforme descrito por Kiyota *et al.* (2012). Na tabela 2 estão listadas as estruturas encontradas em cana-de-açúcar, incluindo dois monômeros (G e S) e seus respectivos aldeídos, três dímeros e quatro trímeros. As ligações interunidade do tipo 8-O-4 (menos recalcitrantes) foram encontradas com relativa frequência entre os oligômeros, enquanto as ligações 8-5 e 8-8 (mais recalcitrantes) foram menos abundantes.

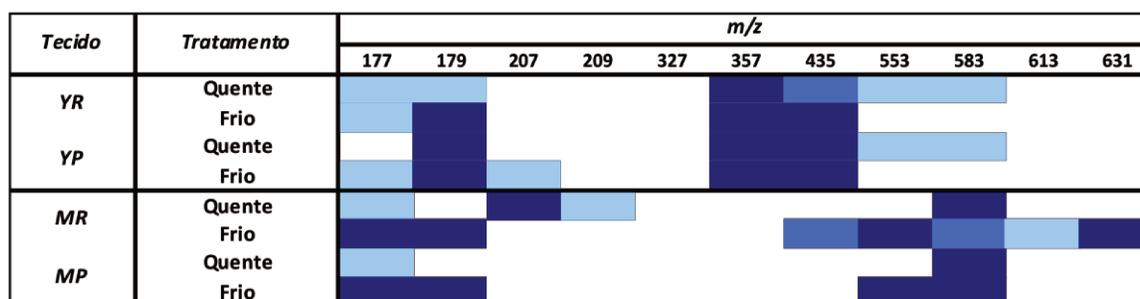
Tabela 2. Estruturas precursoras de ligninas identificadas em cana-de-açúcar, suas respectivas massa-carga (m/z) e tempo de retenção obtidos por UPLC-MS/MS.

Unidade	Estrutura	m/z	Tempo de retenção (min)
<i>Monômeros</i>	coniferil aldeído	177	3,3
	coniferil álcool (G)	179	2,72
	sinapil aldeído	207	3,26
	sinapil álcool (S)	209	2,75
<i>Dímeros</i>	G(8-5)H	327	3,21
	G(8-5)G	357	3,39
	S(8-O-4)G	435	3,91
<i>Trímeros</i>	G(8-O-4)G(8-5)G	553	3,7
	G(8-O-4)S(8-5)G	583	3,57
	G(8-O-4)S(8-8)S	613	3,87 e 4,34
	S(8-O-4)G(8-O-4)S	631	3,65

A análise do padrão de ligninas solúveis indicou que as unidades G e S acumularam-se de forma semelhante nos entrenós jovens e maduros; os dímeros foram mais abundantes nos entrenós jovens e os trímeros foram mais frequentes nos entrenós maduros em ambos os genótipos de cana (fig. 7). De modo geral, observou-se que o monômero álcool coniferil (m/z 179) foi mais frequente que o álcool sinapil (m/z 209). Entre os oligômeros, as estruturas G(8-5)G (m/z 357) e S(8-O-4)G (m/z 435) foram os dímeros mais frequentes, enquanto G(8-O-4)G(8-5)G (m/z 553) e G(8-O-4)S(8-5)G (m/z 583) foram os trímeros predominantes nos entrenós dos genótipos de cana-de-açúcar analisados. O trímero S(8-O-4)G(8-O-4)S (m/z 631) foi particularmente abundante em IACSP04-065 (fig. 7B).

No ambiente frio, a unidade G tendeu a se acumular nos entrenós jovens (YR) e maduros (MR e MP) de plantas IACSP04-627. Nesse genótipo, entre os trímeros identificados no entrenó maduro da cana, somente a estrutura G(8-O-4)S(8-5)G foi encontrada nas plantas crescidas no ambiente quente (MR e MP). As estruturas G(8-O-4)G(8-5)G, G(8-O-4)S(8-8)S e S(8-O-4)G(8-O-4)S foram detectadas no entrenó maduro apenas nas plantas IACSP04-627 expostas ao ambiente frio (fig. 7A).

(A)



(B)

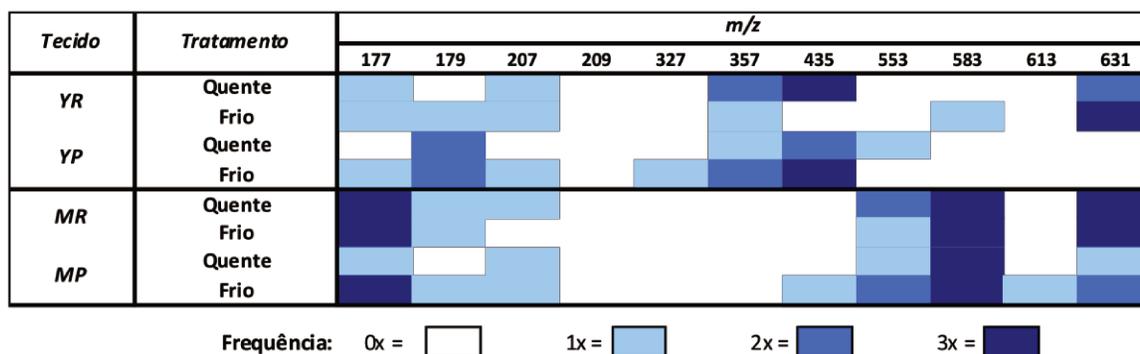


Figura 7. Determinação do padrão de ligninas solúveis por UPLC/MS em dois genótipos de cana-de-açúcar crescidos sob diferentes condições de temperatura ('ambiente quente' e 'ambiente frio'). A frequência de cada estrutura é indicada no diagrama por diferentes intensidades de cor (legenda) e é representada pela média \pm erro padrão de quatro plantas. A = IACSP04-627; B = IACSP04-065; YR = córtex jovem, YP = medula jovem; MR = córtex maduro, MP= medula madura.

Plantas do genótipo IACSP04-065 exibiram maior acúmulo dos dímeros G(8-5)G e S(8-O-4)G no entrenó jovem (YR) em comparação ao entrenó maduro; no ambiente frio, essas estruturas foram menos frequentes comparativamente às plantas crescidas no ambiente quente (fig. 7B). O trímero S(8-O-4)G(8-O-4)S foi o mais frequente no entrenó jovem (YR) das plantas IACSP04-065. No entrenó maduro, as estruturas G(8-O-4)S(8-5)G e S(8-O-4)G(8-O-4)S foram mais abundantes; nas plantas crescidas em ambiente frio, não foram observadas diferenças consistentes no padrão de distribuição dessas estruturas em IACSP04-065.

3.3.3. Quantificação de lignina

O conteúdo de lignina no caule foi crescente do ápice para a base da cana, com os maiores teores sendo observados no córtex comparativamente à medula dos entrenós. O teor de lignina foi cerca de 2,0 e 2,6 vezes maior no córtex (*YR*) do que na medula (*YP*), respectivamente nos entrenós jovens das plantas IACSP04-627 e IACSP04-065. Nos entrenós maduros, essa proporção foi de 4,5 para o genótipo IACSP04-627 e 5,4 para o genótipo IACSP04-065 (fig. 8A e 8B).

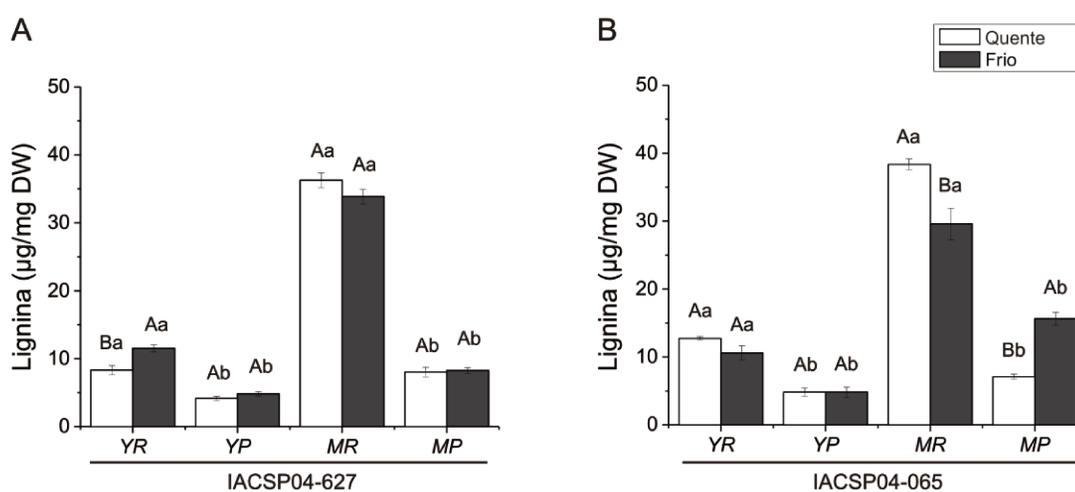


Figura 8. Efeito da temperatura sobre o teor de lignina em regiões distintas do caule em dois genótipos de cana-de-açúcar. As letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre as condições de temperatura dentro do mesmo entrenó e as letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os entrenós dentro da mesma condição de temperatura. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $P \leq 0,05$ (efeito da condição térmica) e pelo Teste *F*, $P \leq 0,05$ (efeito do entrenó/tecido). Cada valor representa a média \pm erro padrão de quatro replicatas. A= IACSP04-627; B= IACSP04-065; *YR*= córtex jovem, *YP*= medula jovem; *MR*= córtex maduro, *MP*= medula madura.

Os dois genótipos de cana-de-açúcar foram diferencialmente afetados pela temperatura de crescimento durante a fase de alongamento dos entrenós do caule. Nas plantas IACSP04-627 crescidas no ambiente frio, observou-se um acúmulo de lignina significativamente maior no córtex (*YR*) em relação às plantas do ambiente quente (fig. 8A). Contrariamente, as plantas

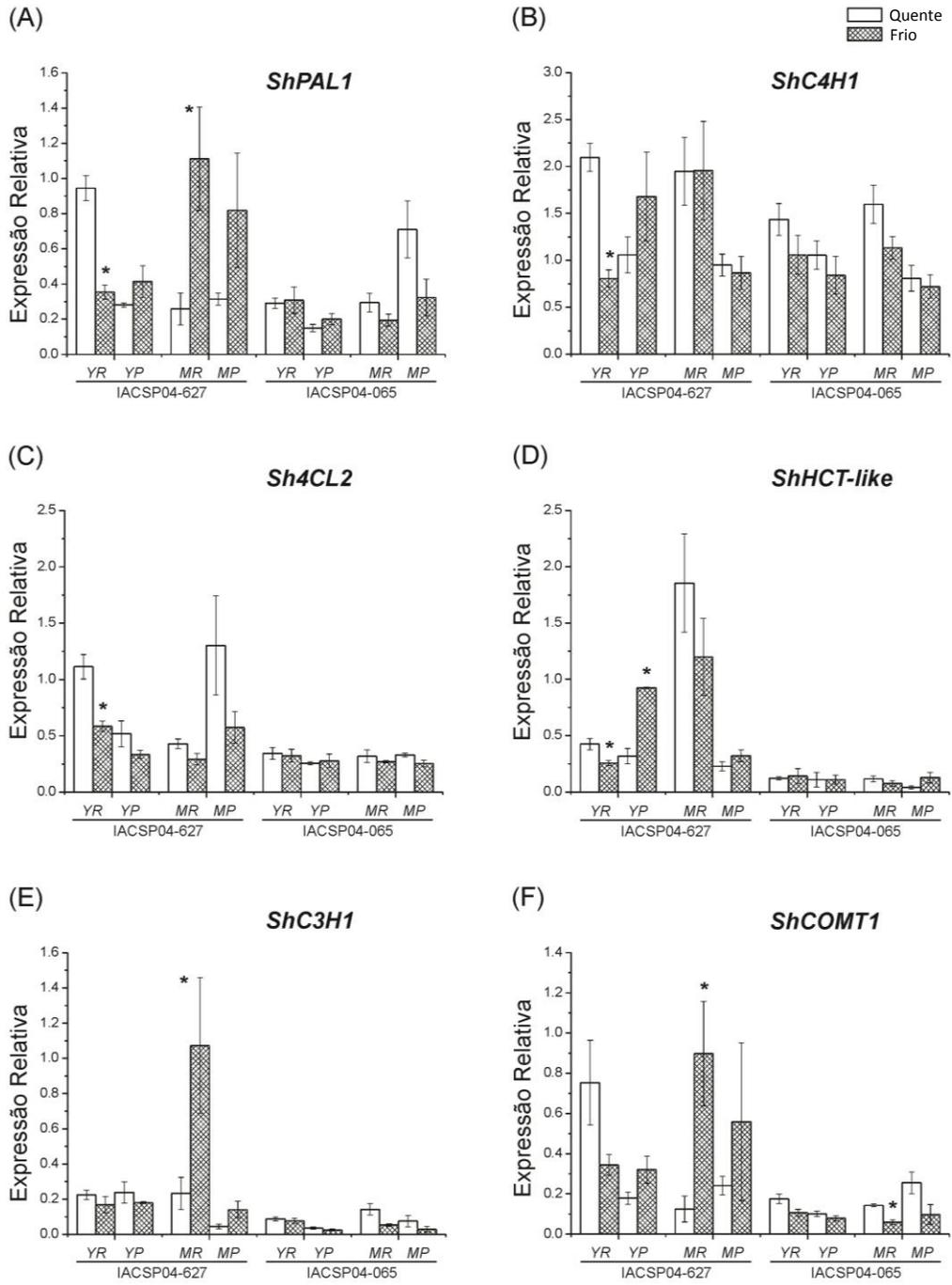
IACSP04-065 apresentaram redução significativa do conteúdo de lignina no córtex maduro (*MR*) em resposta à baixa temperatura, enquanto na medula madura (*MP*) foi verificado um aumento da lignina em comparação ao ambiente quente (fig. 8B).

3.4. Análises de expressão gênica por qPCR

O perfil de expressão dos genes da biossíntese de lignina variou de acordo com o estágio de maturação dos entrenós (jovem e maduro), com o tecido (córtex e medula) e também com o genótipo de cana-de-açúcar analisada. De modo geral, em IACSP04-627 a maioria dos genes foi mais fortemente expressa no entrenó maduro, preferencialmente no córtex das plantas referência. Paralelamente, vários genes também apresentaram elevados níveis de transcritos no córtex e/ou na medula do entrenó jovem (exceto os genes *ShHCT-like* e *ShCAD8*). Nas plantas do genótipo IACSP04-065 crescidas no ambiente quente o padrão de expressão da maioria dos genes da biossíntese de lignina foi similar entre os diferentes tecidos analisados. Nesse genótipo, o nível de expressão de *ShC3H1*, *ShF5H*, *ShCCR1* e *ShCAD2* foi maior no córtex do entrenó maduro, enquanto *ShPAL1* apresentou maior nível de expressão na medula do entrenó maduro das plantas de cana (fig. 9A-9L).

No ambiente frio, as plantas apresentaram alteração no nível de expressão de vários genes da biossíntese de lignina, particularmente nos entrenós maduros (córtex e/ou medula). Os resultados mostraram que no genótipo IACSP04-627 a maioria dos genes aumentou sua expressão (*up-regulated*) sob condição de frio em pelo menos um dos tecidos analisados, enquanto no genótipo IACSP04-065 apenas o gene *ShF5H* exibiu acúmulo significativamente maior de transcritos induzido pelas temperaturas mais baixas (fig. 9I). Nestas condições, observou-se que *ShPAL1*, *ShC3H1*, *ShCOMT1*, *ShCCoAOMT1*, *ShCCoAOMT3*, *ShF5H* e *ShCAD2* foram mais fortemente expressos no entrenó maduro (córtex e/ou medula) em relação às plantas IACSP04-627 de ambiente quente (fig. 9A, 9E, 9F, 9G, 9H, 9I e 9K); já os genes

ShHCT-like e *ShF5H* mostraram acúmulo de transcritos significativo no entrenó jovem (fig. 9D e 9I). Temperaturas mais baixas também levaram à redução do nível de expressão (*down-regulated*) de alguns genes em ambos os genótipos de cana. Em IACSP04-627, os genes *ShPAL1*, *ShC4H1*, *Sh4CL2* e *ShHCT-like* foram significativamente reduzidos no córtex do entrenó jovem (*YR*) em relação às plantas de ambiente quente (fig. 9A, 9B, 9C e 9D). Já nas plantas IACSP04-065, a baixa temperatura levou à redução do acúmulo de transcritos de *ShCOMT1*, *ShCCoAOMT1* e *ShCCoAOMT3* (fig. 9F, 9G e 9H) no entrenó maduro, e de *ShCAD2* no entrenó jovem (fig. 9K). A relação entre o acúmulo de transcritos desses genes e o teor de lignina nos diferentes entrenós do caule em plantas de cana-de-açúcar crescidas em ambiente frio, comparativamente ao ambiente quente, está sumarizada no anexo 2.



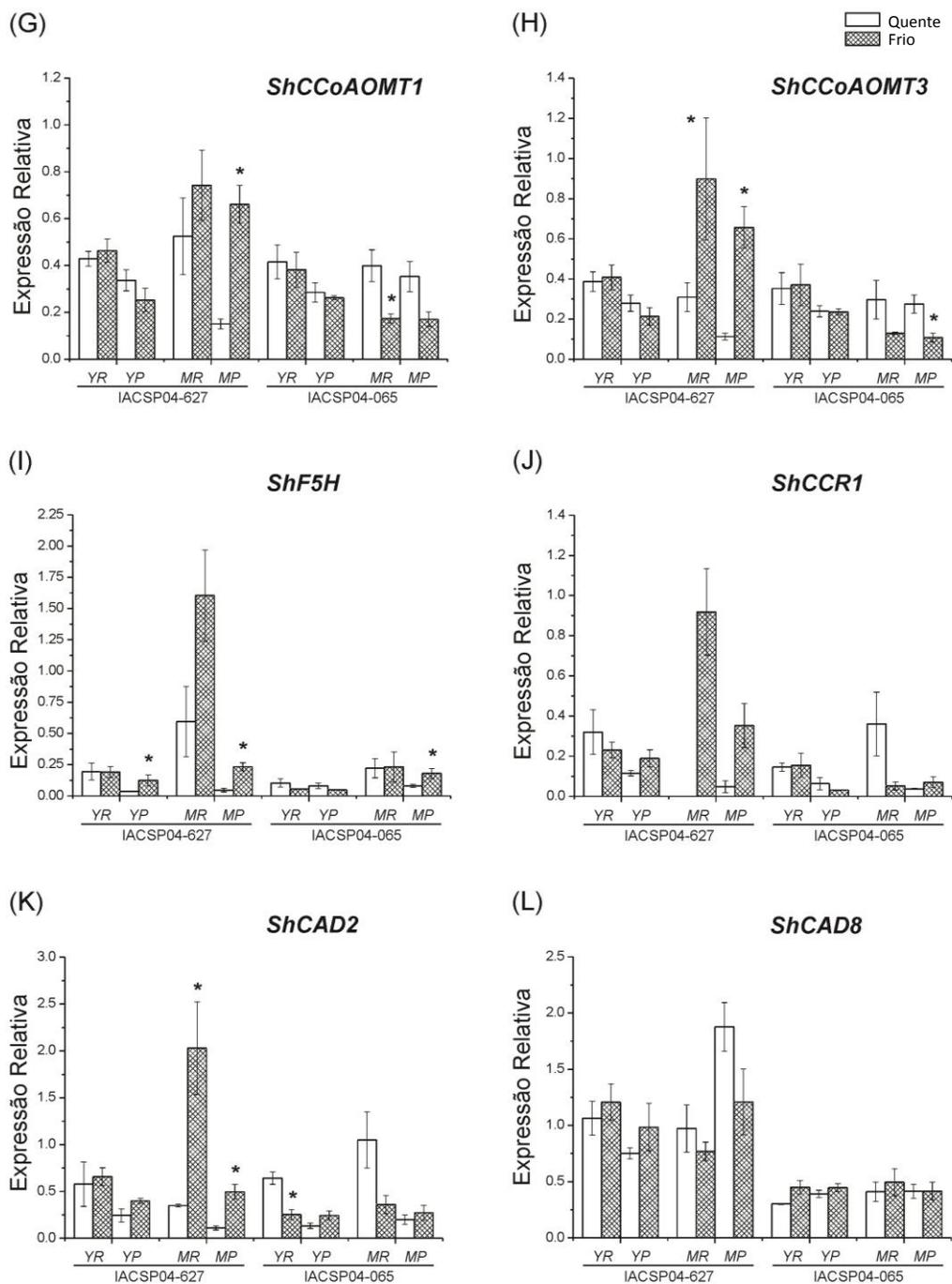


Figura 9. Efeito da temperatura sobre a expressão relativa dos genes da biossíntese de lignina nos genótipos de cana-de-açúcar IACSP04-627 e IACSP04-065 (A-L). A expressão dos genes foi analisada em duas regiões distintas (córTEX e medula) de entrenós jovens e maduros do caule e a normalização foi feita usando *GAPDH* como gene de referência. Plantas sob estresse de frio marcadas com asterisco diferem da respectiva condição referência dentro do mesmo genótipo pelo Teste *F*, $P \leq 0,05$ (efeito da condição térmica). Os valores representam a média da expressão relativa \pm erro padrão de três replicatas. YR = córtex jovem, YP = medula jovem; MR = córtex maduro, MP = medula madura.

4. DISCUSSÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura predominantemente plantada em regiões tropicais e subtropicais, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C. Alguns estudos têm reportado os efeitos do estresse devido a baixas temperaturas sobre o desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar e suas consequências para a produtividade da cultura (Du *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2007; Uehara *et al.*, 2009). Entretanto, até o momento não há registros sobre a influência da temperaturas na lignificação da cana, particularmente durante o processo de deposição de lignina no caule e seus impactos sobre a qualidade da biomassa do bagaço para a produção de biocombustíveis.

Neste sentido, nossos resultados indicam que as baixas temperaturas influenciaram o acúmulo diferencial de lignina no caule dos genótipos de cana-de-açúcar IACSP04-627 (alto teor de lignina) e IACSP04-065 (baixo teor de lignina). Parâmetros de crescimento apontaram que ambos os genótipos de cana foram negativamente afetados pelo ambiente frio em relação às plantas crescidas no ambiente quente. Entretanto, as plantas IACSP04-065 exibiram maior sensibilidade às baixas temperaturas que IACSP04-627, conforme indicado pelas elevadas taxas de redução no comprimento do caule e na massa fresca do caule, respectivamente 57 % e 64 % em IACSP04-065 e 30 % e 33 % em IACSP04-627 (tabela 1). No ambiente frio, a produtividade das plantas também foi afetada pela redução do diâmetro dos entrenós do caule, com IACSP04-065 demonstrando uma nítida tendência de ‘afinamento’ dos entrenós ao longo de todo o caule (fig. 3B).

A cana-de-açúcar é uma planta acumuladora de açúcar e, sob condições adequadas de cultivo, as atuais variedades comerciais possuem a capacidade de estocar até 25 % de sua massa fresca como sacarose (Moore & Maretzki, 1997). A produtividade da cana-de-açúcar está diretamente relacionada à concentração de sacarose no caule, o que fisiologicamente

reflete um balanço entre o crescimento e o acúmulo desse açúcar. Tem sido mostrado que a partição de fotoassimilados na cana varia em função das diferentes fases fenológicas e, que a temperatura pode atuar como um fator modulador desse processo durante o desenvolvimento da planta. Estudos têm mostrado que as baixas temperaturas afetam diversos parâmetros relacionados à fotossíntese em cana-de-açúcar com consequências diretas para o suprimento de carbono e para a síntese, transporte e armazenamento de carboidratos nas plantas (Sales *et al.*, 2012, 2013; Machado *et al.*, 2013). Uehara *et al.* (2009) demonstraram que as baixas temperaturas potencializam o acúmulo de sacarose no caule das plantas de cana, o que segundo os autores não se deve ao aumento da assimilação de carbono, mas ao maior particionamento de carbono em favor do estoque de sacarose.

Com efeito, plantas IACSP04-065 submetidas a baixas temperaturas exibiram aumento significativo do conteúdo de sacarose nos entrenós jovens comparativamente às plantas crescidas no ambiente quente. Ao contrário, foi verificada uma redução do teor de sacarose nos entrenós maduros das plantas IACSP04-627 crescidas no ambiente frio (fig. 4A). As respostas contrastantes demonstradas pelos genótipos de cana sugerem diferentes respostas associadas à aclimação a temperatura, já que os parâmetros de crescimento do caule tais como o comprimento e a massa fresca indicaram que IACSP04-065 foi mais sensível à baixa temperatura que IACSP04-627. A maior redução verificada nas taxas de crescimento das plantas IACSP04-065 poderia explicar o maior acúmulo de sacarose no caule no ambiente frio, ou seja, o armazenamento de sacarose parece ser favorecido à custa da redução do crescimento no genótipo mais sensível. As plantas IACSP04-627, aparentemente menos sensíveis a baixas temperaturas, foram hábeis em manter melhores taxas de crescimento sob condições de estresse, diminuindo o acúmulo de sacarose no caule em relação às plantas do ambiente quente.

Esses resultados são corroborados pelos dados de Bonnett *et al.* (2006) cujo trabalho evidenciou que plantas de cana-de-açúcar crescidas sob temperaturas elevadas (25-38°C) apresentaram menor conteúdo de sacarose em comparação a plantas crescidas sob temperaturas inferiores (23-33°C). Tal constatação indica que a temperatura atua na regulação do particionamento de carbono em favor do alongamento do caule (temperaturas elevadas) ou do armazenamento de sacarose (temperaturas baixas). Reduções dos níveis de glicose e frutose observadas no ambiente frio também foram observadas nos entrenós jovens de IACSP04-065 (fig. 4B e 4C), o que poderia estar relacionado às menores taxas de fotossíntese na folha e à menor taxa de hidrólise de sacarose devido à redução do crescimento das plantas. Resultados obtidos por Sales *et al.* (2012) demonstraram que plantas de cana-de-açúcar submetidas a baixas temperaturas radiculares não exibiram redução significativa da fotossíntese e foram hábeis em manter taxas de crescimento similares às plantas não-estressadas, possivelmente através da degradação das reservas de amido. Segundo os autores, o acúmulo de sacarose verificado nas folhas dessas plantas estaria relacionado à menor eficiência de transporte do açúcar pelo floema, que parece ser bastante sensível à baixa temperatura.

Na cana-de-açúcar, a lignificação do caule começa antes do término do processo de alongação do entrenó, com a formação das paredes celulares primária e secundária no tecido vascular e no esclerênquima e, mais tardiamente, outros tecidos como epiderme, hipoderme e parênquima de reserva também se tornam lignificados (Jacobsen *et al.*, 1992). Análise histoquímica utilizando coloração com floroglucinol-HCl revelou que nos entrenós jovens em alongação os vasos do protoxilema mostraram-se claramente lignificados no córtex e na medula, enquanto as células parenquimáticas apresentaram-se não-lignificadas em ambos os genótipos (figs. 5 e 6).

Trabalhos realizados em outras espécies tais como alfalfa (Jung & Engels, 2002) e milho (Jung & Casler, 2006) têm mostrado que somente os vasos do protoxilema apresentam-se lignificados nos entrenós jovens em elongação. Contrariamente, nosso estudo confirmou que elementos de condução do metaxilema e fibras esclerenquimáticas iniciam seu processo de lignificação nas regiões do córtex e/ou da medula ainda durante a etapa de elongação nos entrenós jovens, conforme evidenciado pela reação positiva ao floroglucinol-HCl (figs. 5E, 5G, 6E e 6G), confirmando os resultados obtidos por Jacobsen *et al.* (1992). Além disso, a análise dos entrenós maduros evidenciou o maior grau de lignificação e espessamento da parede das células parenquimáticas nas plantas IACSP04-627 em relação a IACSP04-065, principalmente na região da medula (figs. 5H e 6H).

A deposição de lignina no caule da cana progride com a maturação dos entrenós, do ápice em direção à base do caule. Estudo recente avaliou o processo de lignificação ao longo do desenvolvimento do caule da cana-de-açúcar e concluiu que o conteúdo de lignina Klason aumenta progressivamente até atingir o quinto ou sexto entrenó e, que o acréscimo nos teores de lignina nos entrenós subsequentes pareceu ser menos significativo (Bottcher *et al.*, 2013). Uma análise quantitativa detalhada do teor de lignina no caule dos genótipos IACSP04-627 e IACSP04-065 confirmou que, o acúmulo de lignina no entrenó maduro comparativamente ao entrenó jovem foi cerca de 3 a 4 vezes maior no córtex e 1,5 a 2 vezes maior na medula (fig. 8). A elevada densidade de feixes vasculares localizada no córtex dos entrenós justifica os maiores níveis de lignina mensurados nessa região, de modo que no entrenó jovem o teor de lignina foi em média 2,3 vezes maior no córtex do que na medula, enquanto no entrenó maduro essa proporção ficou em torno de 5 vezes (fig. 8A e 8B).

A determinação do teor de lignina usando derivatização com ácido tioglicólico a partir dos resíduos álcool insolúveis (AIR) do caule dos genótipos IACSP04-627 e IACSP04-065

apontou que os teores corresponderam, em média, a 0,5 % (medula) e 1 % (córtex) no entrenó jovem e 0,7 % (medula) e 3,7 % (córtex) no entrenó maduro. Estes valores de lignina diferem de outras quantificações realizadas no bagaço da cana (Masarin *et al.* 2011; Rezende *et al.*, 2011), o que *a priori* parece estar diretamente relacionado ao método de análise empregado, além de outros fatores como, por exemplo, a composição da amostra (mistura de nós e entrenós), a idade da planta e a variação entre variedades, impedindo comparações diretas entre tais valores. Nesse sentido, nossas estimativas sobre o conteúdo de lignina nos entrenós da cana reforçaram os dados relatados por de Souza *et al.* (2013) que, utilizando o mesmo método analítico, encontraram 2,5 % de lignina no caule e 4,9 % na folha em plantas com três meses de idade.

A precisão de métodos como Klason, permanganato, fibras em detergente neutro e ácido (NDF/ADF) e acetil bromida, comumente empregados para a determinação da lignina em amostras de forrageiras (especialmente em gramíneas) tem sido discutida (Hatfield & Fukushima, 2005). No caso da utilização do método do ácido tioglicólico para a determinação da lignina em gramíneas, os autores apontaram a possibilidade de quantificações subestimadas da lignina total devido à presença de significativas quantidades de ligninas ácido solúveis, que poderiam permanecer em solução durante as etapas de precipitação em meio ácido, alterando os valores reais da lignina nessas amostras. Apesar dos valores reportados neste estudo, foi possível estimar as diferenças nos teores de lignina em entrenós em diferentes estágios de maturação, bem como as diferentes proporções do polímero nas distintas regiões morfo-anatômicas do entrenó (córtex e medula).

A lignificação é regulada espacial e temporalmente e pode variar entre a parede celular primária e secundária, entre tecidos e os diferentes órgãos da planta (Grabber *et al.*, 2004). Adicionalmente, a biossíntese e a deposição de lignina nas paredes celulares podem ser

afetadas por diferentes condições ambientais tais como seca, baixas temperaturas, radiação UV-B e ataque de patógenos (Moura *et al.*, 2010). Estudo utilizando a técnica de microscopia ultra-violeta (UV) sugeriu que o baixo teor de lignina encontrado nos traqueídes do lenho tardio em *Picea abies* poderia estar associado a temperaturas extremamente baixas (Gindl & Grabner, 2000). Adicionalmente, Gindl *et al.* (2000) concluíram que a lignificação da parede celular em *P. abies* foi positivamente correlacionada com as variações anuais de temperatura. Em milho, a indução de enzimas peroxidases localizadas na parede celular e o aumento do conteúdo de lignina no mesocótilo de plantas expostas a baixas temperaturas poderiam constituir um componente de tolerância ao congelamento (Anderson *et al.*, 1995).

Resultados obtidos pelo presente trabalho mostraram que o teor de lignina foi diferencialmente afetado pela temperatura nos genótipos IACSP04-627 e IACSP04-065. No ambiente frio, as plantas IACSP04-627 acumularam significativamente maior conteúdo de lignina no córtex dos entrenós jovens (*YR*) em relação às plantas do ambiente quente (fig. 8A). Contrariamente, uma redução significativa de lignina foi verificada no córtex dos entrenós maduros (*MR*) das plantas IACSP04-065 em resposta à baixa temperatura (fig. 8B). De acordo com Domon *et al.* (2013), ecótipos de *Miscanthus* com diferentes graus de tolerância ao frio exibiram modificações na composição da parede celular em resposta ao frio e, enquanto no ecótipo sensível o teor de lignina manteve-se inalterado, nos ecótipos tolerantes o conteúdo de lignina foi reduzido durante a aclimação ao frio. Os autores também verificaram significativo aumento da atividade das enzimas PAL e CAD principalmente nos ecótipos tolerantes durante a aclimação ao frio. Assim, as diversas respostas exibidas pelos genótipos de cana-de-açúcar estão relacionadas a aclimação das plantas às variações de temperatura, o que levou a alterações no metabolismo secundário e no acúmulo diferencial de lignina entre esses genótipos.

Embora composta por apenas três unidades básicas (H/G/S) a composição e a estrutura da lignina variam significativamente inter- e intra-espécie. Em adição, compostos fenilpropanóides tais como aldeídos hidroxicinamil, acetatos hidroxicinamil e ácidos hidroxicinâmicos entre outros podem ser oxidados e incorporados ao polímero (Ralph *et al.*, 2001; Boerjan *et al.*, 2003). Deste modo, a abundância relativa dos diferentes monômeros precursores da lignina determina a frequência das diferentes ligações inter-unidades no polímero, que por sua vez podem levar a alterações do polímero e das propriedades da parede celular. Utilizando a técnica de UPLC–MS/MS fomos capazes em identificar um conjunto representativo de ligninas solúveis (monômeros e oligômeros) presentes nos entrenós de cana em diferentes estágios de desenvolvimento. Os resultados indicaram que a unidade G (álcool coniferil, m/z 179) foi mais frequente nas amostras de cana em relação à unidade S (álcool sinapil, m/z 209), independentemente do grau de maturação do entrenó e do tecido analisado (córTEX ou medula). Embora a frequência da unidade H seja relativamente maior em gramíneas (Grabber *et al.*, 2004), assim como previamente reportado por Kiyota *et al.* (2012), não detectamos a presença de monômeros H (álcool *p*-cumaril) em cana e, entre os oligômeros identificados, apenas uma estrutura (G(8–5)H) foi composta pela unidade H (fig. 7B). Em concordância com Bottcher *et al.* (2013), encontramos que os oligômeros de lignina foram mais abundantes nos entrenós maduros, o que foi correlacionado ao aumento da lignificação concomitante à maturação dos entrenós.

No ambiente frio, observou-se maior frequência da unidade G nos entrenós maduros em IACSP04-627 comparativamente às plantas crescidas no ambiente quente. Nos entrenós maduros das plantas IACSP04-627, G(8–O–4)S(8–5)G (m/z 583) foi a única estrutura encontrada; sob baixas temperaturas, verificou-se um maior número de estruturas triméricas, principalmente no córtex (MR) (fig. 7A). As estruturas G(8–5)G (m/z 357) e S(8–O–4)G (m/z

435) foram os oligômeros mais abundantes no entrenó jovem; entretanto, no ambiente frio, suas frequências foram alteradas nas plantas IACSP04-065 crescidas no ambiente quente (fig. 7B). Esses resultados não se correlacionam diretamente com o teor de lignina, contudo o conjunto de estruturas encontradas fornece informações acerca da quantidade relativa dos monômeros da lignina e as frequências das ligações observadas nos oligômeros podem ser úteis na caracterização da biomassa lignocelulósica.

A lignificação está relacionada com o espessamento da parede celular secundária que ocorre em tipos celulares específicos como xilema e fibras. A deposição de lignina requer que a expressão dos genes da biossíntese de lignina seja coordenadamente regulada entre si e em relação a outros genes que controlam processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta (Rogers & Campbell, 2004). O padrão de expressão dos genes da biossíntese de lignina em IACSP04-627 mostrou que o córtex acumulou mais transcritos (exceção para *ShCAD8*) que a medula, confirmando que a deposição de lignina no caule é diferencialmente regulada entre as duas regiões dos entrenós. Paralelamente, observou-se que a maioria dos genes analisados neste genótipo de cana exibiu elevados níveis de expressão nos entrenós jovens em comparação aos entrenós maduros (fig. 9). Ao contrário, nas plantas IACSP04-065, a maioria dos genes apresentou níveis de expressão similar entre as distintas regiões de um mesmo entrenó (figs. 9B, 9C, 9D, 9F, 9G, 9H e 9L). Dos genes diferencialmente expressos em IACSP04-065, *ShPAL1*, *ShF5H* e *ShCCR1* foram mais fortemente expressos no entrenó maduro (figs. 9A, 9I e 9J), enquanto *ShC3H1* e *ShCAD2* acumularam quantidades de transcritos similares nos entrenós jovem e maduro (figs. 9E e 9K).

Esses resultados corroboram os dados obtidos por estudos anteriores que mostraram que o conteúdo de lignina Klason medido em diferentes variedades de cana-de-açúcar, aumenta continuamente até o 5º ou 6º entrenó, a partir do qual se observou uma menor

variação nos incrementos de lignina nos entrenós mais maduros do caule (Lingle & Thomson, 2012; Bottcher *et al.*, 2013). Em milho, foi observado que a maioria dos genes da via de fenilpropanóides apresentava uma máxima expressão nos entrenós jovens, seguido por uma significativa redução nos últimos estágios de desenvolvimento, ao passo que o conteúdo de lignina aumentava progressivamente com a maturidade (Riboulet *et al.*, 2009). Tais dados parecem estar relacionados à formação da parede secundária nos elementos do protoxilema e metaxilema e na bainha de esclerênquima dos feixes, que se inicia nos entrenós jovens ainda em processo de alongação, de modo que no caule completamente desenvolvido, os incrementos de lignina nos entrenós mais tardios são pouco alterados.

Plantas de cana-de-açúcar crescidas no ambiente frio tiveram o perfil de expressão alterado para diversos genes da biossíntese de lignina. Dos 12 genes analisados em cana, IACSP04-627 (alto teor) apresentou oito genes induzidos pelas baixas temperaturas, quase todos no córtex e/ou na medula do entrenó maduro (exceto *ShF5H* e *ShHCT-like*, superexpressos na medula do entrenó jovem), e quatro genes reprimidos, todos no entrenó jovem (córtex). Esses resultados não explicam o acréscimo de cerca de 28 % de lignina no córtex do entrenó jovem das plantas IACSP04-627 expostas ao ambiente frio em comparação ao ambiente quente (fig. 8A). Considerando que as enzimas que atuam nas reações sequenciais da biossíntese dos monolignóis são, em sua maioria, codificadas por famílias multigênicas (Bonawitz & Chapple, 2010), é possível que outros genes da via tenham sido ativados, aumentando a lignificação do córtex no entrenó jovem durante a aclimação as baixas temperaturas. Com efeito, Bottcher *et al.* (2013) identificaram no banco SUCEST 28 unigenes relacionados à biossíntese de monolignóis em cana-de-açúcar e, com exceção de *HCT*, *COMT* e *F5H*, os demais genes apresentaram dois ou mais alelos diferentes. No presente estudo,

apenas os ortólogos mais fortemente expressos em cana, conforme caracterizado por Bottcher *et al.* (2013), foram analisados.

Interessantemente, os genes *ShPAL1* e *ShHCT-like* foram diferencialmente expressos de acordo com a região do entrenó nas plantas IACSP04-627 (fig. 9A e 9D). No ambiente quente, *ShPAL1* foi preferencialmente expresso no córtex do entrenó jovem; já sob baixas temperaturas, a expressão do gene foi elevada no córtex do entrenó maduro e, simultaneamente, reprimida no córtex do entrenó jovem. *ShHCT-like* exibiu maior acúmulo de transcritos na medula do entrenó jovem, enquanto no córtex do mesmo entrenó a expressão do gene foi significativamente reprimida nas plantas IACSP04-627 crescidas no ambiente frio. O genótipo IACSP04-065 (baixo teor) foi aparentemente menos responsivo às baixas temperaturas, de modo que apenas o gene *ShF5H* (fig. 9I) mostrou-se induzido na medula do entrenó maduro, enquanto os genes *ShCAD2*, *ShCOMT1*, *ShCCoAOMT1* e *ShCCoAOMT3* foram menos expressos em relação às plantas crescidas no ambiente quente (figs. 9F, 9G, 9H e 9K). Nesse sentido, o menor conteúdo de lignina verificado no córtex dos entrenós jovem e maduro (*YR* e *MR*) poderia estar associado à repressão desses genes durante o estresse de frio.

Ferulato 5-hidroxilase (F5H) é uma enzima requerida para a síntese da unidade S (siringil) da lignina (Humphreys *et al.*, 1999) e sua superexpressão em *Arabidopsis* (Meyer *et al.*, 1998; Marita *et al.*, 1999), tabaco e *Populus* (Franke *et al.*, 2000) tem resultado em ligninas quase inteiramente formadas por unidades S. Assim, os maiores níveis de expressão de *ShF5H* encontrados em cana-de-açúcar poderiam estar relacionadas à maior produção de unidades S e à intensificação da síntese de parede secundária, precocemente induzida durante a aclimação às baixas temperaturas. De fato, no ambiente frio as plantas IACSP04-065 exibiram maior acúmulo de lignina na medula do entrenó maduro (*MP*), enquanto para IACSP04-627 não foi observada tal correspondência. Bottcher *et al.* (2013) mostraram que a

expressão de *ShF5H* foi induzida com a maturidade dos entrenós e seus transcritos foram preferencialmente acumulados na medula em relação ao córtex, o que segundo os autores, poderia explicar a alta razão S/G encontrada na medula dos entrenós intermediários e maduros da cana-de-açúcar.

A alta complexidade do genoma da cana-de-açúcar traz grandes desafios ao melhoramento convencional e também ao uso de ferramentas da biotecnologia para o melhoramento genético da cultura (Dal-Bianco *et al.*, 2012). Apesar dessa dificuldade, Jung *et al.* (2012) reportaram o sucesso obtido com o silenciamento de *COMT* em cana utilizando a técnica de supressão gênica via RNA de interferência (RNAi). Os autores demonstraram que reduções moderadas do conteúdo de lignina (3,9 % a 8,4 %) diminuíram a recalcitrância da biomassa sem causar efeitos negativos para o desenvolvimento e crescimento das plantas.

Em relação ao uso da biomassa para produção de biocombustíveis, ainda é preciso considerar que as variedades comerciais de cana-de-açúcar usualmente contêm altos conteúdos de lignina (Masarin *et al.*, 2011), um caráter que foi sendo co-selecionado com outras características comercialmente relevantes relacionadas à alta produtividade da cultura (teor de sacarose, resistência ao tombamento etc). Nesse sentido, foi demonstrado que a relação entre produção de biomassa e sacarose com o teor de lignina no caule variou entre os diferentes genótipos de cana-de-açúcar analisados, sendo possível identificar genótipos que combinavam alta produtividade de biomassa/sacarose e baixo teor de lignina (Masarin *et al.*, 2011). Esses dados apontam que é necessário realizar um balanço entre a produtividade das variedades de cana em relação à produção de sacarose e quanto ao aproveitamento real da biomassa, de modo que tenhamos ferramentas para direcionar os diversos potenciais da cultura visando os

melhores resultados, seja pela priorização da alta produtividade primária da cana (sacarose) e/ou da qualidade da matéria-prima (biomassa).

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo caracterizou alguns aspectos da lignificação do caule em dois genótipos de cana-de-açúcar expostos a baixas temperaturas. A análise de crescimento das plantas mantidas na condição ‘ambiente quente’ indicou que IACSP04-627 mostrou maior produtividade média por planta (massa fresca do caule) que IACSP04-065. Temperaturas mais baixas afetaram negativamente o crescimento das plantas e o genótipo IACSP04-065 mostrou-se mais sensível ao ‘ambiente frio’ que o outro genótipo. A deposição de lignina no caule foi diferencialmente regulada entre o córtex e a medula e variou em resposta à temperatura. Plantas IACSP04-627 exibiram aumento significativo no teor de lignina no córtex do entrenó jovem sob condição de frio, o que não pode ser diretamente correlacionado ao perfil de expressão dos genes da biossíntese de monolignóis nessa região. Por outro lado, o ‘ambiente frio’ levou à redução do conteúdo de lignina no córtex dos entrenós jovem e maduro em IACSP04-065, o que poderia estar relacionado ao baixo nível de expressão dos genes *ShCOMT1* e *ShCCoAOMT1*, sugerindo possíveis alvos para a manipulação genética objetivando reduzir a recalcitrância da biomassa em cana. A indução da expressão de *ShF5H* ocorreu preferencialmente na medula do entrenó maduro em ambos os genótipos de cana, o que foi correlacionado à formação precoce da parede celular secundária induzida no ‘ambiente frio’. Embora o assunto demande estudos mais detalhados, os resultados obtidos neste trabalho descreveram preliminarmente os efeitos moduladores da temperatura sobre a lignificação do caule da cana-de-açúcar e suas implicações para a fisiologia da planta, bem como para o aproveitamento do bagaço na produção de biocombustíveis.

6. REFERÊNCIAS

- Anderson, M.D., Prasad, T.K. & Stewart, C.R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione-reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.*, 109: 1247-1257
- Barriere, Y., Ralph, J., Mechin, V., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Argillier, O., Chabbert, B. & Lapiere, C., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 847-860
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 519-546
- Bonawitz, N.D. & Chapple, C., 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu. Rev. Genet.*, 44: 337-363
- Bonnett, G.D., Hewitt, M.L. & Glassop, D., 2006. Effects of high temperature on the growth and composition of sugarcane internodes. *Aust. J. Agric. Res.*, 57: 1087-1095
- Bottcher, A., Cesarino, I., Santos, A.B., Vicentini, R., Mayer, J.L.S., Vanholme, R., Morreel, K., Goemmine, G., Moura, J.C.M.S., Nobile, P.M., Carmello-Guerreiro, S.M., Anjos, I.A., Creste, S., Boerjan, W., Landell, M.G.A. & Mazzafera, P., 2013. Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. *Plant Physiol.*, 163: 1539-1557
- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11: 113-116
- Chen, F. & Dixon, R.A., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnol.*, 25: 759-761
- Chen, L., Auh, C., Chen, F., Cheng, X.F., Aljoe, H., Dixon, R.A. & Wang, Z.Y., 2002. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5558-5565
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - 2013. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (terceiro levantamento da safra 2013/2014), Brasília, DF.

- Dal-Bianco, M., Carneiro, M.S., Hotta, C.T., Chapola, R.G., Hoffmann, H.P., Garcia, A.A.F. & Souza, G.M., 2012. Sugarcane improvement: how far can we go? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23: 265-270
- de Souza, A.P., Leite, D.C.C., Pattathil, S., Hahn, M.G. & Buckeridge, M.S., 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Res.*, 6: 564-579
- DeMartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H.J., Hahn, M.G. & Wyman, C.E., 2013. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. *Energy Environ. Sci.*, 6: 898-909
- Domon, J.M., Baldwin, L., Acket, S., Caudeville, E., Arnoult, S., Zub, H., Gillet, F., Lejeune-Henaut, I., Brancourt-Hulmel, M., Pelloux, J. & Rayon, C., 2013. Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, 85: 51-61
- Du, Y.C., Nose, A. & Wasano, K., 1999. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species. *Plant Cell Environ.*, 22: 317-324
- Ford, C.W., Morrison, I.M. & Wilson, J.R., 1979. Temperature effects on lignin, hemicellulose and cellulose in tropical and temperate grasses. *Aust. J. Agric.Res.*, 30: 621-633
- Franke, R., McMichael, C., Meyer, K., Shirley, A., Cusumano, J. & Chapple, C., 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J.*, 22: 223-234
- Gindl, W. & Grabner, M., 2000. Characteristics of spruce *Picea abies* (L.) Karst latewood formed under abnormally low temperatures. *Holzforschung* 54: 9-11
- Gindl, W., Grabner, M. & Wimmer, R., 2000. The influence of temperature on latewood lignin content in treeline Norway spruce compared with maximum density and ring width. *Trees*, 14: 409-414
- Goldemberg, J., Coelho, S.T. & Guardabassi, P., 2008. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy*, 36: 2086-2097
- Grabber, J.H., 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.*, 45: 820-831

- Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C. & Barriere, Y., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 455-465
- Grof, C.P.L. & Campbell, J.A., 2001. Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28: 1-12
- Hatfield, R. & Fukushima, R., 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.*, 45: 832-839
- Himmel, M.E., Ding, S-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. & Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315: 804-807
- Humphreys, J.M, Hemm, M.R. & Chapple, C., 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10045-10050
- Iiyama, K., Lam, T.B.T. & Stone, B.A., 1994. Covalent cross-links in the cell-wall. *Plant Physiol.*, 104: 315-320
- Iskandar, H., Simpson, R., Casu, R., Bonnett, G., Maclean, D. & Manners, J., 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 325-337
- Jacobsen, K.R., Fisher, D.G., Maretzki, A. & Moore, P.H., 1992. Developmental-changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. *Bot. Acta*, 105: 70-80
- Jain, R., Shrivastava, A.K., Solomon, S. & Yadav, R.L., 2007. Low temperature stress-induced biochemical changes affect stubble bud sprouting in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Plant Growth Regul.*, 53: 17-23
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 523p
- Jung, H.G. & Casler, M.D., 2006. Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Sci.*, 46: 1793-1800
- Jung, H.G. & Engels, F.M., 2002. Alfalfa stem tissues: cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Sci.*, 42: 524-534

- Jung, J.H., Fouad, W.M., Vermerris, W., Gallo, M. & Altpeter, F., 2012. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnol. J.*, 10: 1067-1076
- Keith, E.A., Colenbrander, V.F., Lechtenberg, V.L. & Bauman, L.F., 1979. Nutritional-value of brown midrib corn-silage for lactating dairy-cows. *J. Dairy Sci.*, 62: 788-792
- Khan, N.A., Bedre, R., Parco, A., Bernaola, L., Hale, A., Kimbeng, C., Pontif, M. & Baisakh, N., 2013. Identification of cold-responsive genes in energycane for their use in genetic diversity analysis and future functional marker development. *Plant Sci.*, 211: 122-131
- Kiyota, E., Mazzafera, P. & Sawaya, A.C.H.F., 2012. Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database. *Anal. Chem.*, 84: 7015-7020
- Landell, M.G.A., Campana, M.P., Rodrigues, A.A., Cruz, G.M., Batista, L.A.R., Figueiredo, P., Silva, M.A., Bidóia, M.A.P., Rosseto, R., Matins, A.L.M., Gallo, P.B., Kanthack, R.A.D., Cavichioli, J.C., Vasconcelos, A.C.M. & Xavier, M.A., 2002. A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. Boletim Técnico IAC 193, Instituto Agrônômico, Campinas, 36p
- Lange, B.M., Lapierre, C. & Sandermann, H., 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin - structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol.*, 108: 1277-1287
- Li, X., Weng, J-K. & Chapple, C., 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.*, 54: 569-581
- Lingle, S.E. & Thomson, J.L., 2012. Sugarcane internode composition during crop development. *Bioenergy Res.*, 5: 168-178
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402-408
- Macedo, I.C., 2005. Sugar Cane's Energy - Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability, Berlendis & Vertecchia, UNICA, São Paulo, 237p.
- Machado, D.F.S.P., Lagoa, A.M.M.A., Ribeiro, R.V., Marchiori, P.E.R., Machado, R.S. & Machado, E.C., 2013. Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras.*, 48 (5): 487-495

- Marita, J.M., Ralph, J., Hatfield, R.D. & Chapple, C., 1999. NMR characterization of lignins in *Arabidopsis* altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12328-12332
- Masarin, F., Gurpilhares, D.B., Baffa, D.C.F., Barbosa, M.H.P., Carvalho, W., Ferraz, A. & Milagres, A.M.F., 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol. Biofuels*, 4: 55
- Meyer, K., Shirley, A.M., Cusumano, J.C., Bell-Lelong, D.A. & Chapple, C., 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6619-6623
- Moore, P.H., 1987. Anatomy and morphology. IN: Sugar cane improvement through breeding (D.J. Heinz, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 85-142
- Moore, P.H. & Maretzki, A., 1997. Sugarcane. IN: Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships (Zamski, E. and Schaffer, A.A., eds.) Marcel-Dekker Inc., New York, pp. 643-669
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, J.D.F., Dornelas, M.C. & Mazzafera, P., 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.*, 52: 360-376
- O'Connell, A., Holt, K., Piquemal, J., Grima-Pettenati, J., Boudet, A., Pollet, B., Lapierre, C., Petit-Conil, M., Schuch, W. & Halpin, C., 2002. Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res.*, 11: 495-503
- Olenichenko, N.A. & Zagoskina, N.V., 2005. Response of winter wheat to cold: production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 41: 600-603
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P. & Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Biores. Technol.*, 74: 69-80
- Piquemal, J., Chamayou, S., Nadaud, I., Beckert, M., Barriere, Y., Mila, I., Lapierre, C., Rigau, J., Puigdomenech, P., Jauneau, A., Digonnet, C., Boudet, A.M., Goffner, D. & Pichon, M., 2002. Down-regulation of caffeic acid *O*-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiol.*, 130: 1675-1685

- Qu, T., Liu, R., Wang, W., An, L., Chen, T., Liu, G. & Zhao, Z., 2011. Brassinosteroids regulate pectin methylesterase activity and *AtPME41* expression in *Arabidopsis* under chilling stress. *Cryobiology*, 63: 111-117
- Ralph, J., 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry. Rev.*, 9: 65-83
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J.M., Kim, H., Lu, F.C., Hatfield, R.D., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M.R., Van Doorselaere, J., Sederoff, R.R., O'Malley, D.M., Scott, J.T., MacKay, J.J., Yahiaoui, N., Boudet, A.M., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L. & Boerjan W., 2001. Elucidation of new structures in lignins of *CAD*- and *COMT*-deficient plants by NMR. *Phytochemistry*, 57: 993-1003
- Reddy, M.S.S., Chen, F., Shadle, G., Jackson, L., Aljoe, H. & Dixon, R.A., 2005. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 16573-16578
- Reddy, N. & Yang, Y., 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.*, 23: 22-27
- Rezende, C.A., Lima, M.A., Maziero, P., Azevedo, E.R., Garcia, W. & Polikarpov, I., 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels*, 4: 1-18
- Riboulet, C., Guillaumie, S., Mechin, V., Bosio, M., Pichon, M., Goffner, D., Lapierre, C., Pollet, B., Lefevre, B., Martinant, J.P. & Barriere, Y., 2009. Kinetics of phenylpropanoid gene expression in maize growing internodes: relationships with cell wall deposition. *Crop Sci.*, 49: 211-223
- Rogers, L.A. & Campbell, M.M., 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytol.*, 164: 17-30
- Sales, C.R.G., Ribeiro, R.V., Machado, D.F.S.P., Machado, R.S., DAVIS, V.L. & Lagôa, A.M.M.A., 2012. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares. *Bragantia*, 71(3): 319-327
- Sales, C.R.G., Ribeiro, R.V., Machado, Silveira, J.A.G., Machado, E.C., Martins, M.O. & Lagôa, A.M.M.A., 2013. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. *Plant Physiol. Biochem.*, 73: 326-336

- Siqueira, G., Milagres, A.M.F., Carvalho, W., Koch, G. & Ferraz, A., 2011. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnol. Biofuels*, 4: 7
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bon, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araujo, J.A. & Torres, F.A.G., 2010. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Biores. Technol.*, 101: 4820-4825
- Solecka, D. & Kacperska, A., 1995. Phenylalanine ammonia-lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low-temperature. *Plant Physiol. Biochem.*, 33: 585-591
- Uehara, N., Sasaki, H., Aoki, N. & Ohsugi, R., 2009. Effects of the temperature lowered in the daytime and night-time on sugar accumulation in sugarcane. *Plant Prod. Sci.*, 12: 420-427
- Yuan, J.S., Tiller, K.H., Al-Ahmad, H., Stewart, N.R. & Stewart, C.N.Jr., 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends Plant Sci.*, 13: 421-429
- Zabotin, A.I., Barisheva, T.S., Zabotina, O.A., Larskaya, I.A., Lozovaya, V.V., Beldman, G. & Voragen, A.G.J., 1998. Alterations in cell walls of winter wheat roots during low temperature acclimation. *J. Plant Physiol.*, 152: 473-479

ANEXO 1

Relação entre a expressão de genes da via biossíntese de lignina e o acúmulo de lignina em dois genótipos de cana-de-açúcar crescidos em condição de déficit hídrico.

Gene	IACSP94-2094				IACSP95-5000			
	YR	YP	MR	MP	YR	YP	MR	MP
<i>ShPAL1</i>	↑	↑		↓			↓	↓
<i>ShC4H1</i>	↑			↓				
<i>Sh4CL2</i>	↑	↑			↑	↑		
<i>ShHCT-like</i>	↑							
<i>ShC3H1</i>	↑		↓	↓	↑		↓	↓
<i>ShCOMT1</i>	↑	↑	↓	↓		↑	↓	↓
<i>ShCCoAOMT1</i>	↑		↓	↓			↓	↓
<i>ShCCoAOMT3</i>			↓	↓		↑	↓	↓
<i>ShF5H</i>	↑		↓					↓
<i>ShCCR1</i>	↑	↑		↓	↑			↓
<i>ShCAD2</i>				↓	↑	↓	↓	↓
<i>ShCAD8</i>								
Lignina	↑	↑			↑	↑	↑	

Seta apontada para cima indica expressão ou lignina aumentada (↑) e seta apontada para baixo indica expressão ou lignina reduzida (↓) em plantas sob seca severa em relação ao controle irrigado. O teor de lignina usa o mesmo tipo de anotação. *YR* = córtex jovem, *YP* = medula jovem, *MR* = córtex maduro, *MP* = medula madura.

ANEXO 2

Relação entre a expressão de genes da via biossíntese de lignina e o acúmulo de lignina em dois genótipos de cana-de-açúcar crescidos em condição de baixa temperatura.

Gene	IACSP04-627				IACSP04-065			
	YR	YP	MR	MP	YR	YP	MR	MP
<i>ShPAL1</i>	↓		↑					
<i>ShC4H1</i>	↓							
<i>Sh4CL2</i>	↓							
<i>ShHCT-like</i>	↓	↑						
<i>ShC3H1</i>			↑					
<i>ShCOMT1</i>			↑				↓	
<i>ShCCoAOMT1</i>				↑			↓	
<i>ShCCoAOMT3</i>			↑	↑				↓
<i>ShF5H</i>		↑		↑				↑
<i>ShCCR1</i>								
<i>ShCAD2</i>			↑	↑	↓			
<i>ShCAD8</i>								
Lignina	↑				↓		↓	↑

Seta apontada para cima indica expressão ou lignina aumentada (↑) e seta apontada para baixo indica expressão ou lignina reduzida (↓) em plantas crescidas sob baixa temperatura em relação à condição referência. O teor de lignina usa o mesmo tipo de anotação. *YR* = córtex jovem, *YP* = medula jovem, *MR* = córtex maduro, *MP* = medula madura.