ALEXANDRA BÖTTCHER MARCHESINI

"ESTUDO SISTEMÁTICO DA DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR"

CAMPINAS 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALEXANDRA BÖTTCHER MARCHESINI

2

"ESTUDO SISTEMÁTICO DA DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR"

da tese defendida pelo(a)) candidato (a)
Alexandra Bo	then
Marchesini	
e aprovada pela Comissão	uigadora.

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

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I.B.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

CAMPINAS, 2013

i

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

 Bottcher, Alexandra, 1980-Estudo sistemático da deposição de lignina em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar / Alexandra Bottcher Marchesini. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.
 Orientador: Paulo Mazzafera. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
 1. Cana-de-açúcar. 2. Lignina. 3. Bioenergia. 4. Bioetanol. 5. Expressão gênica. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês Systematic study of lignin deposition in contrasting sugarcane genotypes Palavras-chave em Inglês: Sugarcane Lignin Bioenergy Bioethanol Gene expression Área de concentração: Fisiologia Vegetal Titulação: Doutora em Biologia Vegetal Banca examinadora: Paulo Mazzafera [Orientador] Camila Caldana Wagner Luiz Araújo Arthur Germano Fett Neto Renato Vicentini Data da defesa: 26-03-2013 Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 26 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (orientador)

Dra. Camila Caldana

Assinatura

Assinatura

-

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Wagner Luiz Araújo

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Dr. Renato Vicentini Dos Santos

Dra. Sara Adrián Lopez De Andrade

Dra. Silvana Aparecida Creste Dias De Souza

Dr. Tiago Santana Balbuena

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais com muito carinho, pelo suporte, amor e todo esforço dedicado a minha formação.

> Ao Rafael com muito amor, pelo incentivo, companheirismo e amor, fundamentais para essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação, conversas, amizade e suporte para a realização dessa tese.

Ao querido Rafael Marchesini, meu companheiro e maior incentivador quando eu estava longe de todos os amigos, pais e família. Muito obrigada por sempre me ouvir e acreditar em mim. Amigo fundamental em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos meus pais (Rui Roberto e Antônia Lizonete) e minha irmã (Roberta), exemplos de honestidade e bom caráter, pela minha formação pessoal e profissional, por tudo que sou hoje. Obrigada por todo apoio nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos do departamento (Juca, Igor, Lucas, Pedro, Juzinha, Dri, Lilian, Dudu, Laerti, Kellen, Vivi, Milton, Sara, Adilson, Ju Mayer, Paula Nóbile, Lu) pela ótima convivência, pelo carinho e muitas ajudas.

Aos membros da pré-banca, pelas valiosas sugestões: Dra. Sara Adrián López de Andrade, Dr. Tiago Santana Balbuena e Dr. Ricardo Antunes Azevedo. E aos membros da banca, por toda atenção e ajuda: Dr. Arthur Germano Fett Neto, Dra. Camila Caldana, Dr. Renato Vicentini e Dr. Wagner Luiz Araújo.

Aos queridos Laerti, Kellen e Vivi, que trabalharam duro junto comigo e sem eles esse trabalho não teria sido possível.

Aos meu amigos Fábio Conte e Ana Luiza, que vivem comigo todos os momentos importantes da vida.

Aos meus amigos pseudo-alemães: Danilo, Macel, Anh, Carla e Nádia, e à Manuela, por toda companhia, amizade, passeios e cervejas.

Ao Dr. Alisdair Fernie, Dr. Wagner Luiz Araújo e Dr. Mark Stitt que possibilitaram que meu trabalho na Alemanha rendesse muitos frutos.

A todos que contribuíram de muitas formas para a realização desse trabalho.

... E especialmente à Deus, pela força, saúde e perseverança concedidas para que eu alcançasse esse ideal.

Agradecimentos	v
Índice	vi
Resumo	ix
Summary	X
1. Revisão da literatura	1
1.1. Biocombustíveis	1
1.2. Parede celular	
1.2.1. Biossíntese da Lignina	5
1.3. Cana-de-açúcar	9
Objetivos Gerais	14
Capítulo 1	15
Objetivos - Capítulo 1	
Capítulo 2	
2. Introdução	
2.1. Nitrogênio	
2.2. Luminosidade	
2.3. Objetivos – Capítulo 2	96
2.4. Material e Métodos	97
2.4.1. Material Biológico e Condições de Tratamento	97
2.4.2. Dados Biométricos	
2.4.3. Trocas gasosas	
2.4.4. Avaliação de Açúcares Solúveis	
2.4.5. Dosagens de Lignina	

ÍNDICE

2.4.5.1. Ácido Tioglicólico (TGA)	
2.4.5.2. Lignina Insolúvel Klason (KL)	100
2.4.6. Perfil dos oligômeros de lignina	101
2.4.7. Extração de RNA e Produção de Primeira Fita de cDNA	101
2.4.8. Análise da Expressão Gênica	102
2.4.9. Perfil dos Metabólitos Primários	103
2.4.10. Análises Estatísticas	103
2.5. Resultados	
2.5.1. Dados Biométricos	104
2.5.2. Trocas Gasosas	106
2.5.3. Açúcares Solúveis	107
2.5.4. Dosagem de lignina – TGA	108
2.5.5. Dosagem de lignina insolúvel – KL	109
2.5.6. Perfil dos oligômeros de lignina	110
2.5.7. Análise de expressão	113
2.5.8. Perfil dos Metabólitos Primários	119
2.5.8.1. Aminoácidos	
2.5.8.2. Ácidos Orgânicos	
2.5.8.3. Polióis (sugar alcohols)	
2.5.8.4. Açúcares	
2.5.8.5. Uréia	
2.6. Discussão	135
2.7. Conclusões	156
2.8. Referências	157

Anexo	1	16	3
-------	---	----	---

RESUMO

A lignina é um heteropolímero aromático, cuja formação é mediada por oxidases da parede celular que convertem os monolignóis (os álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil) em radicais livres, que espontaneamente se polimerizam para formar a lignina. Essa reação produz um heteropolímero opticamente inativo e hidrofóbico, composto pelas unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. O nitrogênio (N) é um componente essencial, constituinte de importantes moléculas, e os efeitos da suplementação com N na lignificação têm sido melhor documentados em gramíneas forrageiras, e na maioria dos casos, há um aumento no conteúdo de lignina com a fertilização com N, o que é atribuído a um estimulo na síntese do aminoácido Phe. Entretanto, dependendo da espécie, altas concentrações de N também podem promover queda no conteúdo de lignina. A luz é outro fator ambiental essencial para a sobrevivência das plantas, entretanto, dependendo da intensidade e tempo de exposição, ela também pode causar estresse oxidativo, resultando em inativação das funções fotossintéticas e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Evidências indicam que a alta incidência luminosa ativa a expressão dos genes da via de biossíntese de lignina, promovendo lignificação e enrijecimento de parede. Sendo assim, esse dois fatores podem interferir na taxa de crescimento e deposição de biomassa. Os objetivos desse estudo foram analisar sistematicamente a deposição de lignina durante o desenvolvimento do colmo em duas variedades de cana-de-açúcar crescidas no campo, IACSP04-529 e IACSP04-683, com alto e baixo conteúdo de lignina, respectivamente, assim como a interferência da fertilização com N e baixa luminosidade em outras duas variedades de cana-de-açúcar, IACSP04-627 e IACSP04-065, também com alto e baixo teor de lignina, respectivamente. O conteúdo de lignina aumentou com o amadurecimento do colmo e sua distribuição foi diferente entre a casca (região externa) e o miolo (região interna), e os tratamentos afetaram diferentemente seu acúmulo. Nas plantas do campo, as diferentes regiões anatômicas também mostraram diferenças na composição da lignina (razão S/G) e nas análises histoquímicas, no colmo em desenvolvimento. O banco de EST da cana-de-açúcar foi extensivamente analisado e foram recuperados 4 ortólogos da enzima PAL, 2 C4Hs, 3 4CLs, 2 HCTs, 3 C3Hs, 3 CCoAOMTs, 2 CCRs, 1 COMT, 1 F5H, e 4 CADs, e o padrão de expressão de todos os genes foi obtido por qPCR no material de campo; e os genes que apresentaram os maiores níveis de expressão foram analisados no material submetido aos tratamentos. O perfil dos compostos fenólicos foi realizado com o material proveniente do campo e 35 compostos relacionados com a via dos fenilpropanóides e biossíntese de lignina foram identificados; para as plantas submetidas aos tratamentos foi obtido o perfil dos metabólitos primários e 49 compostos foram identificados. Resumidamente, as informações obtidas com as plantas submetidas aos tratamentos com N e redução da intensidade luminosa, somadas aos dados fisiológicos, bioquímicos, histológicos e transcricionais podem contribuir com importantes informações sobre o metabolismo da lignina em cana-de-açúcar, que podem ser úteis, em longo prazo, para o melhoramento da cana-deaçúcar como matéria-prima para produção de bioenergia.

Palavras-chave: lignina, cana-de-açúcar, bioetanol, bioenergia

SUMMARY

Lignins are complex aromatic heteropolymers, covalently cross-linked with cell wall polysaccharides and deposited mainly in fibers, xylem vessels, tracheids, and sclereids. Lignin is produced by cell wall oxidases which convert the monolignols (p-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohols) in free radicals that spontaneously couple to form lignin. The reaction results in a heteropolymer optically inactive and hydrophobic, composed by the monomers referred to as p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), and syringyl (S) units, respectively. Nitrogen (N) is an essential component of many key macromolecules and the impact of increased N supply on lignification has been mainly documented in forage grasses, and in most cases, the lignin content is increased by N fertilization, which is attributed to the stimulation of phenylalanine (Phe) biosynthesis. However, depending on the plant species, high N supply may also promote decrease in lignin content. Light is other essential factor for plants survival, but depending on the light intensity and the time of exposure, it can also cause oxidative stress. The exposition of plants to high light intensity may result in the inactivation of photosynthetic functions and the production of reactive oxygen species (ROS). Some evidence suggests that high light irradiation stimulates the expression of many genes involved in lignin synthesis, promoting lignification and cell wall stiffening. Thus, both factors may interfere in sugarcane growth rates and biomass accumulation. The aims of the present study were to perform a systematic analysis of lignin deposition during stem development in two sugarcane cultivars grown in the field, IACSP04-529 and IACSP04-683, with high and low lignin content respectively, and to analyze the influence of N fertilization and the reduction of light intensity in two other sugarcane cultivars grown in greenhouse, IACSP04-627 and IACSP04-065, with high and low lignin content respectively. Lignin content increased with maturity and its distribution was differential between rind (outer) and pith (inner) tissues, and the treatments affected its accumulation. For the field plants, these distinct anatomical regions also differed in lignin composition (S/G ratio) and histochemical analysis during sugarcane stem development. Sugarcane EST Database was extensively surveyed and 4 PALs, 2 C4Hs, 3 4CLs, 2 HCTs, 3 C3Hs, 3 CCoAOMTs, 2 CCRs, 1 COMT, 1 F5H, and 4 CADs were identified and the expression pattern of all genes during the stem development was determined by qPCR in field plants; the most expressed genes were also analysed in plants under experimental treatments. The phenolic profiling was analyzed in field plants, and allowed the identification of 35 compounds related to phenylpropanoid pathway and lignin biosynthesis; the primary metabolic profiling was analyzed in greenhouse plants and 49 compounds were identified. To sum up, the information obtained with the plants under different N levels and light reduction treatments, integrated with the physiological, biochemical, histological, and transcriptional data may contribute to unveil significant information regarding the lignin metabolism in sugarcane and might be useful in the long term for the breeding of sugarcane feedstock for bioenergy purposes.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Biocombustíveis

A exploração de combustíveis fósseis, durante a globalização no século passado, impulsionou o desenvolvimento da economia mundial. A demanda por energia continua no século 21, entretanto, a preocupação social em relação ao aumento do preço do petróleo, o aquecimento global devido à emissão de gases de efeito estufa e a busca por seguranca energética, têm levado de políticos a cientistas a explorarem a viabilidade de energias renováveis, como o caso dos biocombustíveis, como alternativas sustentáveis ou suplemento para o combustível fóssil (Li et al., 2008). Biocombustível é definido como energia derivada de qualquer fonte biológica de carbono (Srivastava et al., 2010). Atualmente, os biocombustíveis disponíveis no mercado são o bioéter, biodiesel, biogás, syngas (synthetic gas ou synthesis gas) e o bioetanol, e são produzidos predominantemente a partir do miscanto (Miscanthus giganteus), sorgo (Sorghum bicolor), milho (Zea mays), soja (Glycine max), switchgrass (Panicum virgatum) e cana-de-açúcar (Saccharum spp.) (Li et al., 2008; Srivastava et al., 2010). Em 2006, aproximadamente 5 bilhões de galões de etanol, desenvolvido a partir de milho, foram produzidos nos EUA, o que equivale a somente 3,6% do volume total de gasolina consumida nesse mesmo ano (Li et al., 2008).

O etanol produzido a partir do amido ou açúcar é referido como biocombustível de primeira geração. Nos EUA, a produção de etanol a partir do amido representa a opção mais conveniente e tecnologicamente desenvolvida. Entretanto, essa opção pode resultar em conflitos entre o suprimento de energia e alimento, possivelmente não sendo sustentável em longo prazo (Yuan et al., 2008). Dessa forma, para que os biocombustíveis substituam substancialmente o consumo da gasolina, tem sido proposto que a biomassa advinda da lignocelulose, presente em resíduos agrícolas, como palha de milho, bagaço da cana-de-

açúcar, árvores e gramíneas, seja uma fonte potencial de celulose para produção de etanol (Li et al., 2008). Além disso, alguns cálculos da produtividade de matérias-primas lignocelulósicas, baseados na habilidade de plantas crescerem em áreas agrícolas marginais, indicam que essa produção teria um impacto positivo nas necessidades de combustível para os meios de transporte, sem comprometer significativamente a terra necessária para a produção de alimentos (Rubin, 2008). É estimada que a produção mundial anual de lignocelulose seja de cerca de 1×10^{10} MT, sendo considerada a biomassa renovável mais abundante. Entretanto, apesar dos numerosos benefícios oferecidos pelo uso da lignocelulose, a sua conversão em bioetanol ainda enfrenta obstáculos técnicos e econômicos, e uma eficiente utilização da matéria-prima para obter altos rendimentos e produtividade é necessária (Alvira et al., 2010).

A produção do bioetanol lignocelulósico envolve a coleta de biomassa, hidrólise da celulose e hemicelulose (pré-tratamento e sacarificação), quebra dos açúcares (fermentação) (Figura 1), separação dos resíduos de lignina e finalmente a recuperação e purificação do etanol (Rubin, 2008; Yuan et al., 2008; Alvira et al., 2010). Devido ao recente interesse por esse tipo de combustível, cada passo desse processo está em fase inicial de otimização, em termos de eficiência e rendimento, e dessa forma, os métodos utilizados na sacarificação e fermentação não são ainda de extrema eficiência, além de serem caros. Entretanto, a pressão para se obter fontes renováveis de energia, que substituam o uso dos combustíveis fósseis, tem gerado uma rápida melhora na tecnologia envolvida na produção de biocombustíveis (Rubin, 2008).



Figura 1. Passos para a produção de biocombustível a partir de diferentes matérias-primas. (**a**) Etanol de primeira geração, produzido a partir de açúcar ou amido. (**b**) Etanol de segunda geração, produzido a partir de lignocelulose (modificado de Yuan *et al.* 2008).

1.2. Parede celular

Classicamente, os polissacarídeos da parede celular são agrupados em celulose, hemicelulose e pectinas (Scheller and Ulvskov, 2010). Além disso, algumas paredes celulares contém lignina, um polímero de monolignóis derivados da via dos fenilpropanóides (Liepman et al., 2010).

A celulose tem papel fundamental na organização da parede celular e, geralmente, cerca de um terço da massa total de muitas plantas é constituído por esse polímero. A celulose é formada por uma longa cadeia de moléculas de glicose, as quais estabelecem múltiplas pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias justapostas, o que juntamente com forças de Van der Waals, torna a estrutura da celulose impenetrável a água e, portanto, insolúvel. As microfibrilas são constituidas por aproximadamente 500 a 14.000 moléculas de glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas, apresentam diâmetro de cerca de 3-5 nm e muitos micrometros de comprimento, sendo longa o suficiente para

envolver a célula várias vezes (Cosgrove, 2005; Somerville, 2006; Rubin, 2008). As longas e inelásticas microfibrilas envolvem as células por meio de camadas sobrepostas, promovendo resistência a pressões osmóticas (Somerville, 2006). A celulose é sintetizada por grandes complexos enzimáticos de membrana, chamados celulose sintetase (*CESA*), que liberam a microfibrila na superfície celular (Cosgrove, 2005).

polissacarídeos altamente heterogêneos, As pectinas são tradicionalmente caracterizados pela facilidade de extração por ácido quente ou quelantes, e por possuir grandes quantidades de resíduos de ácido galacturônico, entre eles homogalacturonano, ramnogalacturonano I (RG-I) e II (RG-II) e xilogalacturonano, além de arabinanas e 1,4-βgalactanas (Liepman et al., 2010; Scheller and Ulvskov, 2010). Trata-se de um dos principais componentes da parede celular primária (cerca de 40%) e apresenta-se praticamente ausente, ou em concentrações reduzidas, na parede celular secundária, sendo sua presença bastante restrita à parede celular primária (Willats et al., 2001). A matriz de pectina proporciona um ambiente propício para a deposição, deslizamento e extensão da rede celulósica, está envolvida na porosidade da parede celular e é o maior material aderente entre as células (Willats et al., 2001).

A hemicelulose é segundo constituinte mais abundante na biomassa de lignocelulose (Rubin, 2008). Trata-se de uma família de polissacarídeos heterogêneos, incluindo xilanas, xiloglucanas, β -glucanas, mananas (homopolímeros de resíduos manosil), glucomananas (heteropolímeros de resíduos manosil e glicosil) e formas 1,6- α -galactosiladas desses carboidratos (galactomananas e galactoglucomananas, respectivamente) (Ebringerová et al., 2005; Liepman et al., 2010). As hemiceluloses se ligam às microfribilas de celulose e fazem ligações cruzadas com a lignina, criando uma complexa rede, que oferece resistência estrutural (Rubin, 2008).

A lignina é um polímero tridimensional, que possibilita que os tecidos vegetais tenham resistência à compressão e promove a rigidez da parede celular, protegendo a planta contra ataques de patógenos e insetos (Rubin, 2008). A lignina está presente juntamente com a hemicelulose, nos espaços entre as microfibrilas de celulose, das paredes primárias e secundárias, assim como na lamela média, conectando as células e reforçando as paredes celulares dos tecidos do xilema (Higuchi, 2006)

Por muitos anos a parede celular tem sido amplamente estudada, devido a sua importância para as indústrias têxteis e de papel, e também na indústria alimentícia como parte de alimentos fibrosos. As preocupações atuais relativas aos recursos energéticos fósseis, têm chamado a atenção para o uso desse recurso biológico também como ponto de partida para a produção de biocombustível (Godfrey, 2011).

Alguns obstáculos impedem que o uso da celulose seja economicamente viável e adotado em larga escala. Um dos maiores problemas é que a celulose é uma estrutura cristalina e recalcitrante à hidrólise. Esse problema é ainda agravado pelo fato que a celulose se encontra embebida na complexa matriz das hemiceluloses, que estão covalentemente ligadas à lignina e outros compostos fenólicos aromáticos, e esses componentes limitam o acesso das enzimas hidrolíticas aos polímeros da celulose. A lignina adsorve essas enzimas, que são usadas para gerar monossacarídeos da lignocelulose, além disso, alguns produtos da degradação da lignina inibem os passos subsequentes na fermentação (Li et al., 2008; Shen et al., 2012).

1.2.1. Biossíntese da Lignina

No período Siluriano, há aproximadamente 400 milhões de anos, as plantas sofreram uma transição do meio aquático para o terrestre. Nesse período, elas desenvolveram uma série de estratégias para lidar com a vida na terra, sendo que a habilidade mais marcante foi a capacidade de transportar água e resistir à desidratação (Schilmiller et al., 2009). A via dos fenilpropanóides foi crucial para essa transição, pois os flavonóides e outros derivados dos fenilpropanóides proporcionam proteção contra danos à estrutura do DNA induzidos pelos raios UV e a lignina fornece suporte estrutural para toda a planta, sendo responsável pelas propriedades hidrofóbicas das células condutoras do xilema, além de proporcionar a coesão entre os polissacarídeos da parede celular, impedindo que se se rompam em estruturas menores (Schilmiller et al., 2009; Godfrey, 2011).

O termo lignina deriva do latim *lignum* = madeira (Godfrey, 2011). As ligninas são heteropolímeros fenólicos derivados principalmente de três hidroxicinamoil álcoois (monolignóis), que diferem entre si pelo grau de metoxilação. São eles o *p*-cumaril, coniferil e sinapil. Esses monolignóis produzem respectivamente as unidades *p*-hidroxifenil (H; não metoxilado), guaiacil (G; monometoxilado) e siringil (S; di-metoxilado), ao serem incorporados ao polímero da lignina (Boerjan et al., 2003) (Figura 2).





Os primeiros três passos na via de biossíntese dos fenilpropanóides são comuns a vários compostos formados, pois ao final é produzido *p*-coumaril CoA, que é o ponto de

ramificação entre a produção de flavonóides, monolignóis, lignanas, conjugados de hidroxicinamato e uma série de outros compostos contendo anel fenólico (Schilmiller et al., 2009). A enzima fenilanalina amônia-liase (PAL) possui um importante papel, pois liga o metabolismo primário ao secundário, e tem sido sugerido que a regulação do fluxo geral da via dos fenilpropanóides é modulada pelo limite de velocidade de reação dessa enzima (Singh et al., 2009). A primeira reação é a desaminação do aminoácido fenilalanina (Phe), por essa enzima, gerando o ácido *trans*-cinâmico. Esse ácido é então *para*-hidroxilado pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H) para produzir o ácido *p*-coumárico, que é ativado pelo tio éster CoA correspondente, pela enzima 4-coumarato CoA ligase (4CL), resultando no *p*-coumaroil CoA (Schilmiller et al., 2009).

A enzima C4H constitui a família CYP73, grupo dos citocromos P450 monooxigenases, que em plantas estão envolvidos na biossíntese de diversos metabólitos, como ácidos graxos, fenilpropanóides, alcalóides e terpenóides, e em processos de desintoxicação contra herbicidas e pesticidas (Singh et al., 2009). A enzima 4CL faz parte de uma pequena família gênica, e guia o ρ -coumaroil CoA para diferentes vias biossintéticas. O ρ -coumaroil CoA representa um ponto de ramificação muito importante dentro da via de biossíntese dos fenilpropanóides, pois é substrato para duas enzimas: chalcona sintase (CHS), que catalisa a formação do esqueleto dos flavonóides, pela condensação do ρ -coumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA, e a enzima hidroxicinamoil CoA:shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT), que está envolvida na biossíntese de duas das unidades principais da lignina, chamadas guaiacil e siringil (Besseau et al., 2007; Vogt, 2010). Dessa forma, um passo decisivo é iniciado pela enzima HCT.

A formação dos álcoois coniferil e sinapil envolve a hidroxilação do anel aromático nas posições 3 ou 3 e 5, pelas enzimas ρ -cumarato 3-hidroxilase (C3H) e ferulato 5-hidroxilase (F5H), respectivamente, seguida de metilação pelas enzimas *O*-metil transferases (OMTs) (Pitre et al., 2007). O último passo da biossíntese dos monolignóis envolve a formação de aldeídos pela enzima cinamoil-CoA redutase (CCR), seguida da redução dos álcoois pela cinamil álcool desidrogenase (CAD) (Pitre et al., 2007) (Figura 3).



Figura 3. Via de biossíntese da lignina. As enzimas envolvidas na via são: fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.5), cinamato 4-hidroxilase (C4H; EC: 1.14.13.11), 4-hidroxicinamoil CoA ligase (4CL; EC 6.2.1.12), hidroxicinamoil CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT; EC: 2.3.1-), ρ -Cumarato 3-hidroxilase (C3H; EC: 1.14.18.1), cafeoil-CoA ometiltransferase (CCoAOMT; EC 2.1.1.104), cinamoil-CoA redutase (CCR; EC 1.2.1.44), ferulato 5-hidroxilase (F5H; EC 1.14.13.-), cafeato O-metiltransferase (COMT; EC 2.1.1.68), cinamil álcool desidrogenase (CAD; EC 1.1.1.195), peroxidase (PER) e lacase (LAC) (Li et al., 2008).

A quantidade e composição das ligninas variam entre táxons, tipos celulares e as camadas da parede celular e são influenciadas pelo desenvolvimento e fatores ambientais. Embora existam exceções, as ligninas das angiospermas (*hardwood*) consistem principalmente de unidades G e S, com traços de unidades H, enquanto que as ligninas das gimnospermas

(*softwood*) são compostas, sobretudo, por unidades G (>90%) e pequenos níveis de H. As monocotiledôneas incorporam unidades G e S em níveis comparáveis e uma maior quantidade de H, em relação às dicotiledôneas (Boerjan et al., 2003; Kishimoto et al., 2009). Existe uma variedade de ligações entre os monômeros de lignina, incluindo *8-O-4*, *8-5*, *8-8*, *4-O-5* e 5-5. A ligação *8-O-4* é considerada uma estrutura não condensada, enquanto as outras ligações são condensadas. Plantas ricas em unidades S parecem mais vantajosas que plantas ricas em unidades G, durante os processos de polpação e branqueamento na produção de papel, pois as ligninas *hardwood* são menos condensadas e requerem menor quantidade de químicos, em relação às ligninas *softwood* (Higuchi, 2006; Kishimoto et al., 2009).

A lignificação ocorre pelo acoplamento combinatorial dos monolignóis oxidados/desidrogenados. Essas reações são mediadas por oxidases da parede celular que convertem os monolignóis (os álcoois *p*-coumaril, coniferil e sinapil) em radicais livres, que se polimerizam para formar a lignina. As oxidases envolvidas na formação da lignina podem ser independentes (lacases) ou dependentes (peroxidases) de H_2O_2 (Pomar et al., 2002; Karlsson et al., 2005), sendo que as peroxidases catalisam a oxidação dos monolignóis, utilizando o H_2O_2 como um aceptor de elétrons (Chen et al., 2002). Dessa forma, a lignificação pode ser induzida pelo suprimento de H_2O_2 , cofator da peroxidase (Ralph, 2010).

Embora alguns pesquisadores tenham proposto que a montagem da lignina é essencialmente combinatorial, este assunto é ainda controverso (Naoumkina et al., 2010).

1.3. Cana-de-açúcar

Da mesma maneira que há milhares de anos atrás, quando plantas selvagens, com características desejáveis para se tornarem cultivos alimentares, foram domesticadas, hoje se buscam plantas com potencial para se tornarem culturas energéticas para o futuro. Entre as características analisadas estão a composição da parede celular, taxa de crescimento, adaptação para crescimento em diferentes regiões geográficas e eficiência no uso dos recursos ambientais (Rubin, 2008).

Muitas plantas transformam o CO_2 assimilado primeiro em um composto de 3 carbonos (plantas C_3), enquanto que outras produzem inicialmente um composto de 4 carbonos (plantas C_4). As plantas chamadas C_4 tendem a ser a mais produtivas em termos de acúmulo de massa em situações de estresse, apresentando grande eficiência no uso da luz, água e nitrogênio, durante a assimilação de carbono (Byrt et al., 2011). Entre as plantas C_4 com potencial para produção de energia estão a *switchgrass*, miscanto e o sorgo (Yuan et al., 2008).

O *switchgrass* é uma planta perene, nativa das pradarias da América do Norte. Além de seu uso para forragem, o *switchgrass* tem sido considerado um candidato emergente para a produção de biocombustível, pois cresce muito em altura (3-10 m, dependendo do cultivar), produz grande quantidade de biomassa, desenvolve bem em terras marginais e em condições de seca, além de requerer pouca fertilização (Matts et al., 2010). O miscanto é outra fonte de matéria-prima para a produção de biomassa, principalmente na Europa. Semelhante ao *switchgrass*, o miscanto também é uma planta C_4 perene, apresentando as mesmas vantagens. Entretanto, o miscanto apresenta melhor tolerância ao frio e melhor performance em maiores latitudes (Yuan et al., 2008). Já o sorgo, além de ser o quinto cereal mais cultivado no mundo, trata-se de uma boa opção para produção de etanol, pois é resistente à seca e tolerante ao calor, podendo ser cultivado em terras marginais que não são adequadas para o cultivo de outras plantas. Além disso, não há competição entre a produção de alimentos e energia, uma vez que as sementes do sorgo podem ser utilizadas na alimentação animal e humana, e os caules na produção de etanol (Yuan et al., 2008).

As plantas C₄ apresentam a vantagem de possuírem rápido crescimento, alta densidade de biomassa por unidade de área, baixa necessidade de nutrientes e água, possibilitando, dessa forma, serem cultivadas em terras marginais não aptas para a agricultura (Rubin, 2008). A desvantagem das plantas C₄ é a incapacidade de crescer em climas frios, abaixo de 10°C. Nessas condições, somente as plantas C₃ são potenciais produtoras de energia, como por exemplo, o populus (*Populus trichocarpa*) e o eucalipto, que crescem relativamente rápido (Rubin, 2008). Na Europa, a fonte de açúcar mais utilizada para produção de etanol é a beterraba (*Beta vulgaris*), entretanto, o plantio continuado da beterraba pode aumentar a erosão do solo e diminuir o balanço de energia líquida (Yuan et al., 2008).

A cana-de-açúcar, membro da família da Poaceae, é uma cultura indígena, originária da Nova Guiné, sudeste da Ásia, e como todas as plantas C₄, é altamente eficiente em converter energia solar em biomassa. Todas as cultivares de cana-de-açúcar utilizadas atualmente são resultantes do cruzamento entre *Saccharum officinarum* (2n = 80), uma espécie domesticada que possui alto conteúdo de açúcar e pouca fibra, e *Saccharum spontaneum* (2n = 40–128), uma espécie selvagem, resistente a estresses e doenças, além da possível participação de *Saccharum robustum, Saccharum barberi, Saccharum sinense* e gramíneas relacionadas como *Miscanthus, Erianthus e Narenga* (Roach, 1972; Altpeter and Oraby, 2010; Arruda, 2012). O híbrido é autocruzado com *S. officinarum* para que plantas com alto teor de açúcar sejam geradas (Arruda, 2012). A constituição genômica do hibrido é ainda mais complexa que os parentais (2n = 100–130), preservando 15-25% dos cromossomos da espécie *S. spontaneum*, 60-70% da *S. officinarum* e os 5-10% restantes são cromossomos recombinantes obtidos de ambas as espécies (Arruda, 2012) (Figura 4).



Figura 4. Organização esquemática do genoma de uma cultivar moderna de cana-de-açúcar. Cada barra (*box*) representa um cromossomo; em amarelo representadas regiões originadas de *S. officinarum* e em verde de *S. spontaneum*. Cromossomos alinhados em uma mesma coluna são homólogos (Grivet and Arruda, 2002).

A produção mundial de etanol tem crescido constantemente na última década. No Brasil, por exemplo, entre 2002 e 2009 foi observado um aumento de 13% ao ano, e em 2010 6.921.54 milhões foram produzidos cerca de de galões de etanol (RFA: http://www.ethanolrfa.org/). Atualmente, 54,6% e 39% da produção de cana-de-acúcar no Brasil e na Índia, respectivamente, são destinados à produção de bioetanol. Sendo ambos os países responsáveis por 60% da produção mundial de cana-de-açúcar em 2008 (Lisboa et al., 2011). O Brasil é o país mais bem sucedido na produção de etanol, que com isto reduziu o uso da gasolina. O programa brasileiro de produção de etanol, baseado somente em cana-deaçúcar, resulta em cerca de 4,2 bilhões de galões de etanol por ano (Goldemberg, 2007; Yuan et al., 2008). O cultivo da cana-de-acúcar é considerado muito vantajoso, pois se trata de uma cultura perene. Plantas perenes são mais desejadas para a produção de matéria-prima para bioenergia porque não precisam ser replantadas a cada estação de crescimento, tendo custos de cultivo inferiores (Yuan et al., 2008).

O bagaço é o resíduo obtido após a cana-de-açúcar ser esmagada para a retirada do suco (garapa). Atualmente, a maior parte desse bagaço é queimada para fornecer energia para

os equipamentos de moagem. Em um quilo de massa seca de bagaço são encontradas cerca de 420 g de celulose, 250 g de hemicelulose e 200 g de lignina (Lingle and Thomson, 2012). Outro resíduo importante são as folhas deixadas no campo após a colheita. Cerca de 6-8 toneladas de folhas são obtidas por hectare de plantação. Geralmente essas folhas são queimadas, o que resulta em danos à diversidade microbiana do solo, além de outros problemas ambientais. O bagaço da cana e suas folhas contém uma alta quantidade de celulose e hemicelulose que poderiam ser convertidas em monossacarídeos fermentáveis (Chandel et al., 2012).

Os açúcares obtidos do bagaço e das folhas da cana podem ter um relevante valor econômico, uma vez que podem ser convertidos em bioetanol de segunda geração, tornando-se uma solução sustentável e economicamente viável para a produção de bioprodutos. Teoricamente, uma tonelada de bagaço pode gerar cerca de 300 L de etanol, dependendo da qualidade do bagaço e do processo empregado na produção de bioetanol (Chandel et al., 2012).

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos desse estudo foram analisar sistematicamente a deposição de lignina durante o desenvolvimento do colmo em duas variedades de cana-de-açúcar crescidas no campo, IACSP04-529 e IACSP04-683, com alto e baixo conteúdo de lignina, respectivamente, assim como a interferência da fertilização com uréia e baixa incidência luminosa em outras duas variedades de cana-de-açúcar, IACSP04-627 e IACSP04-065, também com alto e baixo teor de lignina, respectivamente.

CAPÍTULO 1

ESTUDO SISTEMÁTICO DA DEPOSIÇÃO DE LIGNINA EM DUAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM CAMPO

Objetivos - Capítulo 1

O principal objetivo desse capítulo foi caracterizar em duas variedades de cana-deaçúcar, IACSP04-683 e IACSP04-529, com baixo e alto teor de lignina, respectivamente, a deposição desse polímero ao longo do colmo em amadurecimento, separando os tecidos dos entrenós entre casca e miolo.

Para atingir tais propósitos, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Mensuração do conteúdo total e composição da lignina ao longo do colmo em amadurecimento;

2. Analisar histoquimicamente esse material;

3. Determinar o perfil fenólico;

4. Identificação e análise das sequências dos genes envolvidos na biossíntese de lignina e determinação da expressão dos transcritos.

Lignin in sugarcane: biochemical and gene expression characterization of two cultivars contrasting for lignin content

Alexandra Bottcher¹; Igor Cesarino¹; Adriana Brombini dos Santos¹; Renato Vicentini²; Juliana Lischka Sampaio Mayer^{1,3}; Ruben Vanholme⁴; Kris Morreel⁴; Geert Goemine⁴; Jullyana Cristina Magalhães Silva Moura^{1,5}; Paula Macedo Nobile^{1,6}; Sandra Maria Carmello-Guerreiro¹; Silvana Aparecida Creste Dias de Souza⁶; Ivan Antonio dos Anjos⁶; Wout Boerjan⁴; Marcos Guimarães de Andrade Landell⁶; Paulo Mazzafera^{1*}

1 - Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

2 - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas,CP 6010, 13083-875, Campinas, SP, Brazil

3 - Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, CP 3010, 85040-080,Guarapuava, PR, Brazil

4- Department of Plant Systems Biology, Vlaams Instituut voor Biotechnologie, 9052 Ghent, Belgium

5 - Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Av. Getúlio Guaritá, 159, Bairro Abadia, 38025-440, Uberaba, MG, Brazil

6 - Centro de Cana de Açúcar, Instituto Agronômico de Campinas, CP 206, 14001-970, Ribeirão Preto, SP, Brazil

* Corresponding author: pmazza@unicamp.br

(Artigo preparado para submissão em revista dedicada à área de fisiologia, bioquímica, biologia celular e molecular e genética de plantas).

Contribuição individual de cada autor:

- Alexandra Bottcher* Determinações do conteúdo de lignina, extração do material analisado em GCMS, análise das seqüências das enzimas envolvidas na via da biossíntese de lignina, análises filogenéticas e análises de expressão.
- Igor Cesarino* Redação do artigo e colaborou na determinação do perfil fenólico.
- Adriana Brombini dos Santos Análise *in silico* das seqüências das enzimas da via da biossíntese de lignina, análises filogenéticas.
- Renato Vicentini Busca das seqüências no banco de EST da cana-de-açúcar e análises bayesianas.
- Juliana Lischka Sampaio Mayer Testes histoquímicos.
- Ruben Vanholme Análises dos cromatogramas e identificação dos compostos fenólicos.
- Kris Morreel Análises dos cromatogramas e identificação dos compostos fenólicos.
- Geert Goemine Análises em espectrometria de massas para determinação do perfil fenólico.
- Jullyana Cristina Magalhães Silva Moura Análise dos resultados do GCMS.
- Paula Macedo Nobile Análises filogenéticas e desenho de primers.
- Sandra Maria Carmello-Guerreiro Colaboração inicial nos testes histoquímicos.
- Silvana Aparecida Creste Dias de Souza Contribuição com o desenvolvimento do projeto e com o cultivo das canas-de-açúcar e é membro do projeto BIOEN.
- Ivan Antonio dos Anjos Fornecedor das canas-de-açúcar e membro do projeto BIOEN.
- Wout Boerjan Designer dos experimentos relacionados à determinação do perfil fenólico, colaborou na discussão e na produção do manuscrito.
- Marcos Guimarães de Andrade Landell Contribuiu com o desenvolvimento do projeto, forneceu as canas-de-açúcar e é membro do projeto BIOEN.
- Paulo Mazzafera Idealizador do projeto, coordenador da equipe BIOEN e orientador.
 * Os autores contribuíram igualmente para o artigo.

Abstract

Sugarcane is the most prominent bioenergy crop and is currently being used for large scale production of sugar-based bioethanol, the so-called first generation biofuel. Although the use of soluble sugars for ethanol production is the most efficient and convenient option in the case of sugarcane, the fact that this monocotyledonous crop is amongst the most efficient biomass producers known highlights its potential use in cellulosic ethanol production. However, an enhanced understanding of the major factors affecting biomass recalcitrance is required to use the sugarcane lignocellulosic material as biofuel feedstock. In this regard, the characterization of lignin metabolism in bioenergy crops is one of the main focus in the biofuel research, since several studies showed the negative effect of lignin on saccharification yield. Here, we performed a systematic study of lignin deposition during stem development in two sugarcane cultivars contrasting in lignin content. Lignin content increased with maturity and its distribution was differential between rind (outer) and pith (inner) tissues. In addition, these distinct anatomical regions also differed in lignin composition during sugarcane stem development. The phenolic profilig was analyzed by ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry, which allowed the identification of 35 compounds related to phenylpropanoid pathway and lignin biosynthesis. Sugarcane EST Database was extensively surveyed to identify lignin biosynthetic gene homologs and the expression pattern of all identified genes during the stem development was determined by qPCR. To sum up, the integrated physiological, biochemical, histological and transcriptional data contributed to unveil significant information regarding the lignin metabolism in sugarcane and might be useful in the long term for the rational metabolic engineering of sugarcane feedstock for bioenergy purposes.

Key words: bioenergy, bioethanol, gene expression, lignin, phenolic profiling, sugarcane

Abreviations:

PAL = phenylalanine ammonia-lyase; C4H = cinnamate 4-hydroxylase; C3H = p-coumarate 3-hydroxylase; CCoAOMT = caffeoyl-CoA O-methyltransferase; CCR = cinnamoyl-CoA reductase; F5H = ferulate 5-hydroxylase; COMT = Caffeic acid O-methyltransferase; CAD = cinnamyl alcohol dehydrogenase; 4CL = 4-coumarate:coenzyme A ligase; HCT = p-hydroxycinnamoyl- CoA:quinate shikimate p-hydroxycinnamoyltransferase.

INTRODUCTION

For the colonization of dry land, pioneering plants were confronted with several challenges such as UV irradiance, water loss, lack of structural support and co-evolving pathogens and herbivores. To overcome these problems, several physiological adaptations emerged, including the development of specialized metabolic pathways, among which phenylpropanoid was one of the most important (Ferrer et al., 2008). Among all phenylpropanoid derivatives, the acquisition of lignin is considered a crucial evolutionary step for the dominance of the terrestrial ecosystem since this polymer confers physical rigidity and strength to the stem, waterproofs the cell wall for long-distance water transport and consists in a defensive barrier against pathogens and herbivores (Weng and Chapple, 2010; Godfrey, 2011). Lignin is mainly deposited in the secondarily thickened cell walls of tracheary elements and fibers where, together with hemicellulose, forms a complex matrix in which cellulose microfibrils are embedded. The deposition of lignin not only follows a developmental program but can also be affected by environmental conditions such as biotic and abiotic stresses and mineral nutrition (Moura et al., 2010).

Lignins are complex aromatic heteropolymers produced by the oxidative combinatorial coupling of mainly three *p*-hydroxycinnamyl alcohol monomers differing in their degree of methoxylation, *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols (Boerjan et al., 2003). When incorporated into the lignin polymer (Figure 1), these monomers are called *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) units, respectively, and their individual contribution to lignin composition varies significantly among species, cell types and between tissues in the same plant (Bonawitz and Chapple, 2010). In addition to the three canonical monolignols, other phenylpropanoids can be incorporated into the polymer at varying levels, including hydroxycinnamates, hydroxycinnamyl aldehydes and hydroxycinnamyl acetates (Raes et al.,

2003). In general, the lignins from non-flowering vascular plants (i.e. lycophytes, ferns and gymnosperms) are composed mostly of G units with minor amounts of H units, whereas angiosperm dicotyledonous lignins are composed of G and S units and traces of H units. In monocotyledonous, both S and G units are present at similar levels and the amount of H-units is relatively higher (Vanholme et al., 2010). Additionally, grass lignin contains significant amounts of the hydroxycinnamates ferulic acid and *p*-coumaric acid (Vogel, 2008).



Figure 1. Representation of lignin biosynthetic pathway and the enzymes involved. PAL = phenylalanine ammonia-lyase; C4H = cinnamate 4-hydroxylase; C3H = p-coumarate 3-hydroxylase; CCoAOMT = caffeoyl-CoA O-methyltransferase; CCR = cinnamoyl-CoA reductase; F5H = ferulate 5-hydroxylase; COMT = Caffeic acid O-methyltransferase; CAD = cinnamyl alcohol dehydrogenase; 4CL = 4-coumarate:coenzyme A ligase; HCT = p-hydroxycinnamoyl-CoA:quinate shikimate p-hydroxycinnamoyltransferase; PER = Peroxidase; LAC = laccase.

Lignocellulosic biomass refers to plant biomass composed of the polymers cellulose, hemicellulose, and lignin. Lignocellulose presents a highly complex nature due to its molecular structure and heterogeneity, where cellulose is arranged in a tight network of microfibrils embedded in a matrix of hemicellulosic polysaccharides that are covalently crosslinked with the heterogenic and complex structure of lignin (Vega-Sanchez and Ronald, 2010). The recalcitrant nature of this mixture is one of the major obstacles to convert plant cell wall polysaccharides into fermentable sugars for biofuels production (Vanholme et al., 2010; Cesarino et al., 2012b). The ability of lignin to resist degradation makes this phenolic polymer the major plant cell wall component responsible for biomass recalcitrance. The fact that lignin is a non-linear polymer built with different monomer units linked by chemically diverse and low reactive bonds precludes the ability of any single enzyme to properly recognize and degrade it (Weng et al., 2008). Furthermore, lignin and some of its by-products, formed during the removal of lignin from biomass, can also inhibit the enzymes that carry out the fermentation process, decreasing biofuel yield (Simmons et al., 2010). Consequently, biomassto-biofuel conversion process requires costly and harsh chemical pre-treatments to degrade lignin, loose the rigid cell wall and access the monomeric hexoses and pentoses for saccharification (Vanholme et al., 2010). Recently, genetic engineering has been extensively used to produce plants that either accumulate less lignin or produce lignins that are more amenable to chemical degradation, in an attempt to facilitate the processing of plant biomass to biofuels (Carroll and Somerville, 2009).

The main biofuels available nowadays on the market are bioethanol and biodiesel. The bioethanol is produced through the fermentation of sugars or starch, predominantly from sugarcane, corn grain, soybean oil, wheat, sugar beet, cassava and others, and is often referred to as first-generation biofuel (Yuan et al., 2008; Waclawovsky et al., 2010). Brazilian sugarcane ethanol is one successful example of efficient use of renewable energy (Goldemberg, 2007). Sugarcane is an indigenous crop originally from New Guinea (Southeast Asia) and grown in all tropical and subtropical regions of the world, on both sides of the

equator (Lisboa et al., 2011). As a C4 plant, sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) varieties present high capacity to convert solar radiation into biomass and also have a unique feature within the Poaceae family that is the ability to accumulate up to 50–60% of dry weight of stem as sucrose in the mature tissues (Casu et al., 2004). At present, Brazil is the world's largest sugarcane producer, with 612 million tons during 2009/2010 crop season, from which 25 billion liters of ethanol were generated (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Brazil and the United States are the leading countries in ethanol production, using sugarcane and corn, respectively. However, production of ethanol from sugarcane has the advantage to not directly compete with food production and to have a better energy balance and highest potential to reduce net greenhouse gas emission when compared to other systems (Lisboa et al., 2011). Other technical and economic advantages are discussed by Goldemberg (2007).

An emerging effort has been expended to increase the production of biofuels based on lignocellulosic biomass, the so-called second generation ethanol (Dias et al., 2009). In tropical countries, sugarcane bagasse, the residue produced after sucrose extraction, is the most plentiful lignocellulosic material. One ton of sugarcane originates 280 kg of bagasse, which is composed by 39% cellulose, 25% hemicelluloses and 23% lignin, among other minor components (Carroll and Somerville, 2009; Rabelo et al., 2011). Currently, the remaining bagasse is used for generation of heat and power for sugar processing into ethanol and also to produce electricity that is sold into the grid (Carroll and Somerville, 2009). Therefore, the production of second generation ethanol could be advantageous for the sugarcane industry, since the sugarcane bagasse is promptly available after sucrose extraction for ethanol/sugar production and cellulosic bioethanol could be co-produced and share part of the infrastructure where the first generation ethanol is obtained (Dias et al., 2009; Rabelo et al., 2011; Dias et

al., 2012). For such a purpose, a more fundamental understanding of biomass recalcitrance is required in order to fully benefit from the potential of cellulosic biofuels.

The study of lignin biosynthesis and deposition in plant cell walls is one of the main focus in biofuel research, since studies with different plant species identified lignin as the major factor in recalcitrance of cell walls to saccharification (Chen and Dixon, 2007; Berthet et al., 2011; Fu et al., 2011). However, despite the recent advances in the understanding of lignin metabolism (Vanholme et al., 2012), there is still much to be explored and determined in terms of gene expression and lignin polymerization (Zhao and Dixon, 2011; Gray et al., 2012) Additionally, most of our knowledge regarding lignin metabolism is derived from studies in dicotyledonous herbaceous plants like *Arabidopsis* and alfalfa, but the mechanisms underlying lignin biosynthesis are not necessarily conserved among all vascular plants (Li et al., 2008; Gray et al., 2012).

In addition to sucrose and cellulose, lignin is also an important trait for sugarcane breeding (Creste et al., 2010), but much of the information on sugarcane lignin comes from the research on the potential use of sugarcane as animal forage. Specific breeding programs are developed in Brazil to obtain sugarcane varieties for animal forage (Anjos et al., 2008). Although very variable among reports on the nutritional value of sugarcane cultivars, lignin content seems to vary from 4 to 10% DW (Landell et al., 2002). Lignin varies according to the neutral detergent fiber (NDF), which is a measure of digestible fiber, and consequentely, plants with low NDF have also low lignin levels and can supply more energy for ruminants. Therefore, lignin is the primary limiting factor to use fiber carbohydrates as source of energy to ruminants (Van Soest, 1994).

Modern sugarcane cultivars are derived from the hybridization between two species, Saccharum officinarum and Saccharum spontaneum, and are considered allopolyploid hybrids

24

and present a highly complex genome (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Consequently commercial sugarcane cultivars are propagated vegetatively due to a large genetic variation. Therefore, here we present data of a systematic study of lignin deposition during stem development in two distinct cultivars of sugarcane. Our aim is to provide physiological, biochemical, histological and transcriptional data on the monolignols biosynthesis pathway, tracing a detail signature of lignin and phenolics components in the sugarcane stem of two cultivars of a population bred to be used as forage. Information on lignin metabolism in sugarcane is very scarce and genetic information available is limited to a few genes, resulting from a general large scale transcriptional profiling (Papini-Terzi et al., 2005; Papini-Terzi et al., 2009). Lignin deposition was quantified in internodes throughout the whole stem. Histochemical analysis of internodes at three developmental stages showed differential lignin accumulation between rind (outer) and pith (inner) tissue layers in the sugarcane stem. Due to this developmental discrepancy, the same stem samples were used for determination of S/G ratio by gas chromatography-mass spectrometry and phenolic profiling using liquid chromatography-mass spectrometry. Sugarcane EST Database (http://sucest-fun.org) was extensively surveyed to identify phenylpropanoid pathway genes and the expression of all identified genes was analyzed by qPCR.
MATERIALS AND METHODS

Plant materials and growth conditions

Two sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) cultivars, IACSP04-683 and IACSP04-529, with low and high lignin content were used in the study. Both cultivars belong to a segregating progeny originated in the sugarcane breeding program carried out at the Sugarcane Center of the Agronomic Institute, at Ribeirão Preto, SP, Brazil. They were selected based on three years of evaluation for several technological traits used by the sugarcane Brazilian industry, including lignin content. On average they were the plants containing the highest and the lowest contents of lignin among 66 individuals of the progeny. The plants were maintained in the field under usual fertilization and agronomical procedures for first sugarcane ratoon. The material harvested for analysis was from the first ratoon.

The internodes 2 (from the apex) to 18 were used for lignin analyses in the stem. Anatomical and histochemical analyses were carried out in internodes 2, 10 and 15, while phenolic profiling was performed in a pool of young (1, 2 and 3) and mature (15, 16 and 17) internodes only. For gene expression (qPCR) and monomeric lignin composition (S/G ratio), the sugarcane materials were separated in three pools of internodes, the first made with young internodes (internodes 1, 2, and 3), the second with intermediary internodes (internodes 5, 6, and 7), and the third with mature internodes (internodes 15, 16, and 17). Except for Klason lignin analysis and the phenolic profiling, each pool of internodes was separated in central (pith) and peripheral (rind) regions. The aim to separate rind from pith was a manner to get samples enriched with vascular bundles. Immediately after separation of pools and tissues (rind and pith) the plant materials were frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until analyses. From now on materials will be referred further on as young-pith (YP), young-rind (YR), intermediary-pith (IP), intermediary-rind (IR), mature-pith (MP) and mature-rind (MR). A blade was used to obtain the rind, which was removed by cutting thin strips along the internodes (Cesarino et al., 2012b).

Lignin determination

Klason method was used for lignin determination, as described by Hatfield & Fukushima (2005). Klason lignin was expressed as percentage of dry cell wall residues.

Thioacidolysis and S/G determination

Thioacidolysis was carried out according to Lange et al. (1995) and the reaction products were analysed by gas chromatography – mass spectrometry (Lapierre et al., 1991), using a Shimadzu equipment (GCMS-QP Plus 2010) equipped with a moving needle type injector and a flame ionization mass detector. Silylated samples were injected onto a polydimethylsiloxane capillary column (DB5; 30 m, 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 pm; J & W Scientific) and helium was the gas carrier, using a temperature program from 160 to 260°C at 2°C min⁻¹. Mass spectra were recorded at 70 eV.

Histochemical Analysis

Stem samples were collected from young (internode 2), intermediary (internode 10), and mature (internode 15) internodes. Samples were fixed under vaccum in FAA 50 (formaldehyde-acetic acid-ethanol) (Johansen, 1940), for 12 h at 4°C, dehydrated in an ethanol series (10, 30, 50 and 70%,) and then in a tertiary-buthylic alcohol series (70, 85, 95 and 100%) (Johansen, 1940), for 48 h in each solution. The last step in 100% tertiary-butyl alcohol was repeated 3-times. To the samples in 100% tertiary-butyl alcohol it was added ³/₄ volume of solid resin Paraplast X-tra (Fisher) and maintained at 58°C. The Paraplast[®] was changed 3-

times, every 12 h. The samples were placed on molds to solidify and serial sections (20 μ m thick) were cut on a rotary microtome (Leica), and distended in plates heated at 48°C. The Paraplast[®] was removed by immersion of the slides in xylene and the sections were subsequently rehydrated in absolute ethanol followed by distilled water. The sections were stained with safranin and astra-blue (Gerlach, 1969), and mounted in Entellan synthetic resin (Merck). Phloroglucinol was used for histochemical analysis of lignin (Johansen, 1940). Photomicrographs were taken with an Olympus BX 51 photomicroscope equipped with an Olympus DP71 camera.

Phenolic profiling

Lyophilized stem tissues were ground into powder and an aliquot of 10 mg was extracted with 1 mL of 90% methanol at 70°C for 10 min while shaking. After centrifugation, 900 μ L of supernatant was dried and the remnant was resuspended in 200 μ L of 1:1 (v/v) cyclohexane:MilliQ H₂O. After centrifugation, the aqueous phase was recovered and a 15 μ L aliquot was subjected to LC-MS analysis with an Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system (Waters) connected to a Synapt HDMS quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Micromass). Chromatographic separation was performed on a Waters Acquity BEH C18 column (2.1 mm x 150 mm; 1.7 μ m) with a gradient elution, with the mobile phases composed of (A) water containing 1% acetonitrile and 0.1% formic acid and (B) acetonitrile containing 1% water and 0.1% formic acid. During the gradient elution, a flow rate of 350 μ L min⁻¹ was applied, with initialization at time 0 min 5% (B), 30 min 50% (B), and 33 min 100% (B). The MS parameters were used as described by Grunewald et al. (2012).

The identity of phenolic compounds was confirmed by accurate mass measurements and fragmentation patterns using Masslynx software (Waters). For relative quantification of each identified compound, chromatograms were integrated and aligned with the MzMine 2.2 software (Katajamaa and Oresic, 2005). The final peak list contained only peaks that were present in all three biological replicates of at least one sample type. Principal component analysis was performed with the prcomp function available in R version 2.6.2.

Analysis of the Brazilian Sugarcane EST Database

The Sugarcane Assembled Sequences (SASs) can be found at the SUCEST database (http://sucest-fun.org). A blastx search of SASs against the sequences of proteins involved in lignin biosynthesis from *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, and *Arabidopsis thaliana* was performed (e-value cutoff $< e^{-5}$). In a second step, a new blastx alignment included also the representative species of the Viridiplantae protein data set (*Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Selaginella moellendorffii* e *Physcomitrella patens*). The SAS coding-sequences were deduced from the amino acids alignment with the blastx best-match hit. The translated SAS was then aligned with the 40 first blastx hits by MAFFT (Katoh et al., 2005) using default parameters. Comparative analysis of sugarcane lignin genes was done by constructing phylogenetic relationship of the aligned protein sequences was then inferred by maximum-likelihood using PhyML (Guindon et al., 2010) with WAG plus gamma substitution model and aLTR test. This process allowed identifying the most probable lignin orthologue gene for each identified SASs.

Phylogenetic Analysis

In addition, with the purpose to study the phylogenetic relationship among the protein sequences from each gene family, i.e. PAL, C4H, 4CL, C3H, HCT, CCoAOMT, CCR, F5H, COMT, CAD, a second method was performed for the phylogenic trees constructions. As a complementary search, the SASs identified previously were queried by BLASTx (Altschul et al., 1997) into the non-redundant protein databases (UNIPROT, http://www.uniprot.org/; TAIR, http://www.arabidopsis.org/; NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/; and by tBLASTx into MAIZEWALL nucleotide database, http://www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/MAIZEWALL/index.html/). The aminoacid sequences were aligned with the ClustalW program included in MEGA 5 (Tamura et al., 2011) and then used to construct a phylogenetic tree using the neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987). Gap regions were excluded by manual adjustments. Bootstrap values were obtained after 5,000 replications.

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Frozen material from rind and pith regions of the stems was ground to a fine powder in liquid N₂ using a pre-cooled mortar and pestle and then c.a. 1 g of pulverized tissue was extracted as described in Chang et al. (1993). Total RNA was quantified at 260 and 280 nm and a sample loaded onto 1% agarose gel with ethidium bromide for quality inspection under UV 254 nm. Five micrograms of total RNA was treated using Turbo-DNase-free (Ambion) and the first-strand cDNA synthesis was carried out using Superscript III (Invitrogen). Both procedures followed the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR

The relative abundance of transcripts of 29 genes in different tissues (YP, YR, IP, IR, MP, MR) of cultivars IACSP04-529 and IACSP04-683 was determined using qPCR analysis from total RNA samples. Quantitative PCR assays were carried out in an optical 96-well plate with an iCycler iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using QuantiFastTM SYBR[®] Green PCR Kit (Quiagen) to monitor dsDNA synthesis. Cycling conditions consisted of 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. The PCR efficiency was estimated by LinReg Software (Ramakers et al., 2003) and was >90% and <110% for all primers used (Table S1). Confirmation of amplicon specificity was based on the dissociation curve at the end of each run. In order to obtain an accurate internal normalization, the expression stability of three references genes ubiquitin (UBO; forward: 5'-TATCAACAGCAATGGGAGCA-3'; reverse: 5'-GTCAGAAGGGAGCAGATGGA-3'), 5'- CTCCACATTCATCGGCAACTC -3'; reverse tubulin (Tub;forward: 5'-TCCTCCTCTTCTTCCTCCTCG -3'), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; forward: 5'-TTGGTTTCCACTGACTTCGTT-3'; reverse 5'-CTGTAGCCCCACTCGTTGT-3') were investigated using the NormFinder software (Andersen et al., 2004). GAPDH was the most stable and transcript expression levels were standardized to transcripts of GAPDH as a reference gene. Each gene reaction was performed in triplicate, and PCR reactions in the absence of template were also performed as negative controls for each primer pair. Relative quantification (RQ) was determined comparing the transcriptional expression between tagged genes and the reference gene GAPDH by the formula: $2^{-\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = (Ct_{tag} - Ct_{ref})$, Ct = threshold cycle, tag=tartg gene, andref=*reference* gene. This method was derived from the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). To better visualize the graphics generated, the data $2^{-\Delta Ct}$ were log transformed.

Bayesian Network Analysis

The Bayesian network analysis was performed using the BNFinder software (Wilczynski and Dojer, 2009). A total of 35 datapoints were collected from the network that had samples from young, intermediary and mature internodes, while 11 datapoints from the network including biochemical data. In the obtained networks we assumed that genes can depend on conditions (genetic, morphological and biochemical characters) but not the opposite. Also the orientation of the regulatory interactions was inferred. It was specified that the qPCR data were continuous measurements, and that other data (the two sugarcane cultivars; the young, intermediary and mature internodes from pith and rind; the monomeric lignin composition; the lignin content; and other biochemical information) were discretized. The Bayesian-Dirichlet equivalence (BDe) scoring criterion was used to obtain the network structure for these discrete and continuous variables. In this study the interactions represented the fact that one variable depends on some other variable, and the type of interaction can have a positive or negative correlation between variables. The network topology was properly reconstructed using Cytoscape (Smoot et al., 2011). Because the data on phenolic profiling was obtained only with mature and young internodes, we produced a network specific for this specific analysis, in which data obtained in the intermediary internodes were not included.

Statistical analysis

T test was used to assess differences in lignin concentration in the tissues of IACSP04-529 and IACSP04-683 cultivars. Three technical replicates were made for each of the three biological replicates of each sample. For thioacidolysis analysis, only one technical replicate was made for each of three biological replicates. Data were expressed as mean and standard error of the mean (\pm SEM). A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess differences in gene expression and phenolic profiling among the analyzed stem tissues. When a significant variation was found, Tukey's test was used as a post hoc comparison to adjust *P* values. Analyses were carried out using the software GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), except for phenolic profiling data for which SAS Enterprise Guide 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used.

RESULTS

Developmental deposition of lignin in sugarcane stems

Lignin deposition during stem development was histochemically assessed by staining with phloroglucinol-HCl. Internodes in the apex (young) and in the intermediary and basal internodes (mature) were analysed (Figure 2). Anatomically, the stem is composed of numerous vascular bundles randomly distributed throughout the storage parenchyma. However, histochemical analysis of sugarcane stem cross-sections clearly showed that pith (internal tissue) and rind (periphery) are two distinct regions (Figures 2A-C). While the rind had high frequency of vascular bundles with wide sclerenchymatic sheath and minor amounts of parenchyma, in the pith, the rich sucrose-storing parenchyma is permeated by a smaller number of vascular bundles containing less abundant sclerenchymatic sheath. In addition, developmental differences between these two anatomic regions increase with stem maturity. Both cultivars studied here showed similar structural tissue organization (Figure 2).

In young internodes (internode 2) of cultivar IACSP04-529, lignification is restricted to tracheary elements of protoxylem in the vascular bundles of the rind and pith regions (Figures 2A and 2D), while in IACSP04-683, besides the tracheary elements of protoxylem, lignin is also present in the tracheary elements of metaxylem and in the fibers of bundle sheath (Figures 2I). Lignified cell types in intermediary and mature internodes (internodes 10 and 15, respectively) of both cultivars included the epidermis, hypodermis, parenchymatic cells, tracheary elements of metaxylem and schlerenchyma surrounding the vascular bundles (Figures 2B, 2C, 2E, 2F, 2G, 2H, 2J-2M). Since epidermis and hypodermis undergo lignification, the rind region, which also contains numerous vascular bundles densely packed in the outermost tissues, presents a differential accumulation of lignin when compared to the pith. Therefore, we found convenient to separate these two regions and most of the further

analyzes were carried out using separated pith and rind samples, from internodes at different developmental stages.



Figure 2. Transversal sections of the internodes of sugarcane cultivars stained for lignin with phloroglucinol. Cultivar IACSP04-529 (figures A-H); Cultivar IACSP04-683 (figures I-M). Second internode (A, D, I); tenth internode (B, E, G, J, L); fifteenth internode (C, F, H, K, M). Peripheral region (A-C); detail of the vascular bundle of the central region (D-F; I-K); detail of the vascular

bundle of the peripheral region (G-H, L-M). f = fibers; mx = metaxylem; ph = phloem; px = protoxylem. Bars: D-M = 50 µm, A-C = 200 µm. The ordinal numbers indicate the position of the internode. "<- rind pith->" indicates their position in the photos.

Lignin content and composition during sugarcane stem development

To precisely understand the developmental program of lignin deposition in sugarcane stem, lignin content was measured throughout the whole stem, from internode 2 to internode 18 (Figure 3A). Klason method showed, in both cultivars, that insoluble lignin content leveled starting from 4-5th internodes and, for most of the internodes, IACSP04-529 accumulated more insoluble lignin than IACSP04-683. This was particularly evident in the older internodes.

Thioacidolysis and GC-MS analysis were used to determine the monomer yields for syringyl (S) and guaiacyl (G) from the pith and rind of internodes at different developmental stages (Table S2), while their respective S/G ratios were summarized in Figure 3B. Variation in S/G ratio during the stem development showed the same pattern in both analyzed sugarcane cultivars. In the rind, the S/G ratios were higher in young tissues, followed by a significant decrease in this ratio in intermediary and mature tissues. On the other hand, in young tissues S/G ratios in each tissue were statistically different between cultivars only in young rind, in which IACSP04-529 showed a significant higher S/G ratio, and in intermediary pith, in which IACSP04-683 presented higher S/G ratio than IACSP04-529. It is noteworthy to observe that the low S/G ratios in the peripheral regions of intermediary and mature tissues (IR and MR), which varied between 0.31 and 0.85, suggest an abundance of G units (see Table S2).



Figure 3. Percentage of insoluble lignin content in sugarcane internodes in cultivars IACSP04-529 and IACSP04-683, obtained with Klason method (A). S/G ratio values in cultivars IACSP04-529 and IACSP04-683, obtained by GC-MS (B). YR = rind of young internode, YP = pith of young internode, IR = rind of intermediary internode, IP = pith of intermediary internode, MR = rind of mature internode. Error bars indicate ± standard error of the mean (n = 3). Asterisks indicate significant difference based on *t* test (* P \leq 0.05; ** P \leq 0.01; *** P \leq 0.001; **** P \leq 0.0001) between cultivars for each internodes (A) or tissue (B).

Developmental changes in phenolic profile

Methanol extracts of stem tissues were analyzed by UPLC-MS to compare changes in phenolic profile during stem development of both sugarcane cultivars. This procedure resulted in 2904 peaks, which were used for principal component analysis (PCA) to provide an initial overview of the phenolic profiling of young and mature stem tissues from both sugarcane cultivars (Figure 4). This analysis showed that mature tissues can be clearly differentiated from young tissues, but significant differences can still be observed for the same tissue type of different sugarcane cultivars.



Figure 4. Principal component analysis of the compounds identified in the phenolic profile analysis. Young (\Box) and mature (\blacksquare) internodes of high lignin cultivar IACSP04-529 and young (\bigcirc) and mature (\bullet) internodes of low lignin cultivar IACSP04-863.

Phenolic compounds were identified by matching with in-house mass spectra libraries, taking into account parameters such as m/z, retention time, brutal formula and fragmentation pattern by MS/MS. The identification procedure was focused on metabolites involved in lignin biosynthesis, from early steps in the pathway to final products of monomer polymerization, and also on related phenylpropanoid compounds such as flavonoids. Thirty five compounds were reliably identified and classified into four major groups (Table 1): 8 chlorogenic acids, 3 hydroxycinnamic acids, 14 lignin oligomers and 10 flavonoids. Within the chlorogenic acid group, cinnamate conjugates with quinic acid, including isomers of caffeoyl- and feruloyl-quinate, and shikimic acid, including isomers of caffeoyl-shikimate, were identified. The hydroxycinnamic acids *p*-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid were also found, while no hydroxycinnamyl aldehydes were identified. A sequencing strategy for lignin oligomers (Morreel et al., 2010), allowed not only the identification of oligomer monomeric composition but also the differentiation of linkage types between subunits within an individual oligomer.

Dimers, trimers and tetramers composed of G and S units linked by 8-8-, 8-5- and 8-*O*-4linkages were found. In addition, oligomers containing coniferylaldehyde, sinapylaldehyde and ferulic acid as subunits, as well as conjugated with hexose, were also positively identified. Interestingly, no oligomer containing H units was detected in the stem samples, despite the fact that grass lignin contains relatively higher levels of H units. In the case of flavonoids, 10 flavones were identified, all of them derived from tricin and tricin *O*-glycosides. A limited number and types of flavonoids were found since those compounds are better detected when mass spectrometer is operated in positive ion mode, while in our analysis negative ion mode was used.

Table 1. Phenolic profiling of sugarcane stems.

Phenolic profiling was performed in young and mature stem regions of the cultivars IACSP04-529 and IACSP04-683 with reverse-phase UPLC connected to a Synapt HDMS quadrupole Q-Tof. Names of oligolignols are based on Morreel et al. (2004). The linkage type in the oligolignols is indicated in parentheses and units derived from ferulic acid, coniferylaldehyde as well as *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl units are designated FA, G', H, G and S, respectively. The term "red" indicates reduced adjacent linkage. Ref indicates a bibliographic reference for MS data; t_R , retention time.

	Compound (Ref)		t _R	m/z	m∕z MS²	Δppm	Relative Abundance			
Class		Formula					IACSP04-529		IACSP04-683	
							YOUNG	MATURE	YOUNG	MATURE
Hydroxycinnamates esters	Caffeoyl-quinate (Ref1)	C16H17O9	2.94	353.0859	191, 179, 135	-4.5	4.54 x 10 ⁵	7.48 x 10 ³	3.97 x 10 ⁵	7.42 x 10 ⁴
	Caffeoyl-quinate (Ref 1)	C16H17O9	4.20	353.0859	191, 173, 161, 133, 127	-3.7	1.54 x 10 ⁵	5.53 x 10⁴	1.14 x 10 ⁵	1.68 x 10 ⁵
	Caffeoyl-quinate (Ref 1)	C16H17O9	4.51	353.0859	191, 179, 173, 135, 133	1.7	1.36 x 10 ⁵	1.49 x 10 ⁴	7.29 x 10 ⁴	1.03 x 10 ⁵
	Caffeoyl-quinate (Ref 1)	C16H17O9	5.59	353.0859	191, 173, 161, 133, 127	2.5	2.05 x 10 ⁴	2.42 x 10 ³	2.50 x 10 ⁴	1.99 x 10 ⁴
	Feruloyl-quinate (Ref 1)	C17H19O9	4.68	367.1029	193, 134	-1.6	8.11 x 10 ⁴	1.07 x 10 ⁴	1.92 x 10 ⁵	1.02 x 10 ⁵
	Feruloyl-quinate (Ref 1)	C17H19O9	6.74	367.1029	193, 191, 173, 134	-1.9	3.58 x 10 ⁴	4.92 x 10 ³	4.31 x 10 ⁴	2.52 x 10 ⁴
	Caffeoyl- shikimate (Ref 2)	C16H15O8	5.58	335.0767	191, 179, 173, 135	-5.1	1.45 x 10⁴	2.69 x 10	1.80 x 10⁴	1.47 x 10 ²
	Caffeoyl- shikimate (Ref 2)	C16H15O8	6.96	335.0767		-1.8	3.42 x 10 ³	1.13 x 10	6.97 x 10 ²	3.01 x 10
Hydroxycinnamates	<i>p</i> -coumaric acid (Ref 3)	C9H7O3	6.78	163.0395	119	1.8	3.45 x 10⁴	5.70 x 10 ⁴	3.09 x 10 ⁴	3.65 x 10 ³
	Caffeic acid (Ref 3)	C9H7O4	4.90	179.0344	135	-2.3	1.22 x 10 ⁴	8.98 x 10 ²	7.09 x 10 ³	6.20 x 10 ³
	Ferulic acid (Ref 3)	C10H9O4	7.94	193.0501		-35.7	1.03 x 10 ³	2.32 x 10 ²	5.46 x 10 ²	5.75 x 10
Oligolignols	S(8-8)S (Ref 4)	C22H25O8	10.89	417.1549	402, 387, 181, 166, 151	1.0	3.70 x 10 ²	1.13 x 10 ³	1.49 x 10 ²	1.49 x 10 ³
	S(8-O-4)S' (Ref	C22H25O9	12.56	433.1487	418, 403,	-2.8	6.05 x	1.45 x	3.38	9.38 x

	4)				385, 373		10 ²	10 ⁴		10 ²
	G(red8-5)G (Ref 4)	C20H23O6	10.59	359.1495		-4.5	1.07 x 10 ³	6.92 x 10 ²	3.49 x 10 ²	4.49 x 10 ²
	G(t8-O-4)G (Ref 4)	C20H23O7	8.18	375.1444		-4.8	3.57 x 10 ²	1.57 x 10 ³	7.87 x 10	3.29 x 10 ²
	G(8-O-4)FA (Ref 4)	C20H21O8	10.91	389.1236		2.8	1.40 x 10 ³	1.11 x 10 ⁴	5.00 x 10 ²	1.06 x 10 ²
	G(red8-8)G, lariciresinol + hexose (Ref 4)	C26H33O11	10.71	521.2023	503, 491, 488, 476, 341, 329	2.7	4.60 x 10 ³	1.23 x 10 ⁴	4.15 x 10 ³	2.28 x 10 ⁴
	G(8-O-4)S(8-5)G (Ref 5)	C31H35O11	14.74	583.2179	535, 505, 369, 357, 195, 165, 150	-1.0	9.29 x 10 ³	2.39 x 10⁴	4.84 x 10 ³	5.98 x 10 ³
	G(8-O-4)S(8-5)G (Ref 5)	C31H35O11	15.56	583.2179	535, 369, 357, 195, 165, 150	-1.2	5.14 x 10 ³	1.60 x 10 ⁴	2.55 x 10 ³	3.73 x 10 ³
	G(8-O-4)S(8- 5)G' (Ref 5)	C31H33O11	16.26	581.2023	369, 193	-1.9	7.52 x 10 ²	4.03 x 10 ³	4.52 x 10 ²	8.20 x 10 ²
	G(8-O-4)S(8- 5)G' (Ref 5)	C31H33O11	16.76	581.2023	551, 533, 503, 367, 355, 165, 150	0.9	4.13 x 10 ³	3.05 x 10⁴	1.21 x 10 ³	4.56 x 10 ³
	S(8-O-4)S(8-5)G (Ref 5)	C32H37O12	16.69	613.2285	467, 369, 325, 195, 163	-11.6	5.62 x 10 ²	1.14 x 10 ³	2.92 x 10 ²	6.13 x 10 ²
	S(8-O-4)S(8-8)S (Ref 5)	C33H39O13	16.43	643.2404	595, 417, 225	2.0	2.27 x 10 ²	1.34 x 10 ³	1.27 x 10 ²	1.22 x 10 ³
	G(8-O-4)S(8- 8)S(4-O-8)G (Ref 5)	C42H49O16	18.02	809.3021	791, 761, 613, 565, 417	3.1	1.73 x 10 ³	7.28 x 10 ³	6.24 x 10 ²	2.76 x 10 ³
	G(8-O-4)S(8- 8)S(4-O-8)G (Ref 5)	C42H49O16	18.70	809.3021	791, 761, 613, 565, 417	4.4	1.61 x 10 ³	5.98 x 10 ³	8.13 x 10 ²	2.62 x 10 ³
Flavonoids	Tricin	C17H13O7	17.09	329.0661	314, 299, 271, 227	18.5	1.54 x 10 ⁴	8.30 x 10 ³	5.45 x 10 ⁴	1.76 x 10 ⁴
	Tricin-7-O- neohesperoside (Ref 6)	C29H33O16	10.87	637.1769	329	-3.8	4.07 x 10 ³	2.11 x 10 ³	1.98 x 10 ³	2.05 x 10 ³
	Tricin-7-O- neohesperoside	C29H33O16	11.47	637.1769	329, 314	-0.5	7.87 x 10 ³	1.15 x 10 ⁴	1.42 x 10 ⁴	1.32 x 10 ⁴

(Ref 6)									
Tricin-7-O- glycoside (Ref 6)	C23H23O12	7.33	491.119		9.8	2.29 x 10 ²	1.69 x 10 ³	1.58 x 10 ²	5.97 x 10 ²
Tricin-7-O- glycoside (Ref 6)	C23H23O12	9.99	491.119	461, 329	7.9	1.31 x 10 ³	1.32 x 10 ³	1.97 x 10⁴	6.29 x 10 ³
Tricin-7-O- glycoside (Ref 6)	C23H23O12	11.43	491.119	476, 461, 343, 329, 314	-5.7	9.41 x 10 ³	5.15 x 10 ³	7.29 x 10 ³	9.00 x 10 ³
Tricin-4'-O- guaiacyl ether (Ref 6)	C27H25O11	18.02	525.1397	477, 329, 314, 299, 195, 165, 150	-0.4	1.32 x 10 ⁴	1.32 x 10⁴	3.19 x 10 ⁴	3.00 x 10 ⁴
Tricin-4'-O- guaiacyl ether (Ref 6)	C27H25O11	18.74	525.1397	329, 314, 299, 195, 165, 150	2.7	8.73 x 10 ³	7.52 x 10 ³	2.46 x 10 ⁴	2.45 x 10 ⁴
Tricin-4'-O- guaiacyl ether-7- O- glucopyranoside (Ref 6)	C33H35O16	12.86	687.1925	525, 491, 329, 314, 195, 165, 150	-0.3	1.27 x 10⁴	1.06 x 10⁴	1.31 x 10⁴	3.07 x 10⁴
Tricin-4'-O- guaiacyl ether-7- O- glucopyranoside (Ref 6)	C33H35O16	13.60	687.1925	525, 491, 329, 195, 165, 150	-1.7	8.36 x 10 ³	6.56 x 10 ³	4.74 x 10 ³	1.24 x 10⁴

Ref 1 - Clifford, 2003; Ref 2 - Niggeweg et al. (2004); Ref 3 - Duarte-Almeida et al. (2011); Ref 4 - Morreel et al. (2010b); Ref 5 - Morreel et al. (2010a); Ref 6 - Colombo et al. (2006).

After normalization, relative abundances were compared among all samples to unveil the accumulation pattern of each identified compound throughout the stem development. In the case of the cultivar IACSP04-529, chlorogenic acids showed a preferential accumulation in young internodes and a sharp decrease in relative abundance in mature internodes. For the cultivar IACSP04-683, this pattern was true only for an isomer of caffeoyl quinate and two isomers of caffeoyl shikimate, while the relative abundances of other chlorogenic acids were not statistically different between tissue types. In addition, when the same tissue type from different cultivars were compared, it was clear that IACSP04-683 mature tissues showed a relatively higher chlorogenic acid content when compared to IACSP04-529, while no significant differences were observed for young tissues. In general, the relative abundance of hydroxycinnamic acids was higher in young internodes, and mature tissues of cultivar IACSP04-683 contained higher amounts of cafeic acid but lower amounts of *p*-coumaric and ferulic acid, when compared to IACSP04-529.

Conversely, lignin oligomers preferentially accumulated in mature internodes in both cultivars, as already expected since the deposition of lignin increases with maturity. The exceptions were G(red8-5)G, which was more abundant in young internodes in cultivar IACSP04-529 and G(8-O-4)FA, which accumulation was higher in young internodes in cultivar IACSP04-683. However, for oligomers at more advanced degree of polymerization (trimers and tetramers), higher abundances were always found in mature internodes. The comparison of relative abundances of lignin oligomers between sugarcane cultivars is also in agreement with the data showing higher lignin content of cultivar IACSP04-529; with the exception of dimers S(8-8)S and G(red8-8)G, all lignin oligomers were more abundant in tissue samples from cultivar IACSP04-529, although the differences were often not statistically significant. Finally, within flavonoids there were no significant change in

accumulation related to stem development, while comparison between cultivars showed that IACSP04-683 presented higher overall levels of such compounds, especially tricin, tricin-7-*O*-glycoside and both isomers of tricin-4'-*O*-guaiacyl ether (Table 1).

Identification of genes associated with monolignol biosynthesis

SUCEST database was surveyed to identify monolignol biosynthetic genes in sugarcane, based on the annotated genes from Arabidopsis, sorghum, rice and maize. A total of 28 genes were identified, which were 4 *PALs* (EC 4.3.1.5), 2 *C4Hs* (EC 1.14.13.11), 3 *4CLs* (EC 6.2.1.12), 1 *HCT* (EC 2.3.1.133) and 1 *HCT*-like (EC: 2.3.1-), 2 *C3Hs* (EC 1.14.13.36), 3 *CCoAOMTs* (EC 2.1.1.104), 2 *CCRs* (EC 1.2.1.44), 1 *COMT* (EC 2.1.1.68), 1 *F5H* (EC 1.14.13.-), and 4 *CADs* (EC 1.11.1.195). SAS tentative consensus number, the respective sugarcane gene names and the primer sequences designed for qPCR analysis are shown in the Table S1. Their expression profile is shown in Figure 5. The phylogenetic analysis of amino acid sequences of monolignol biosynthesis enzymes was retrieved from NCBI, TAIR, Uniprot and MAIZEWALL databases and the identified homologs in sugarcane are shown in Figures S1-S10.

Phylogeny and transcript abundance of PAL family: PAL is the enzyme that catalyzes the first step in the phenylpropanoid pathway, producing cinnamic acid by the deamination of phenylalanine (Fraser and Chapple, 2011). The Arabidopsis genome contains four genes enconding PAL proteins, while the PAL family in maize is composed of five members (Raes et al., 2003; Riboulet et al., 2009). A total of four SASs annotated PAL were identified in sugarcane (Figure S1). PAL proteins are phylogenetically distributed in 3 major groups. The first group is formed exclusively by monocot sequences and includes *Sh*PAL2 and *Sh*PAL3,

which share 87% sequence identity. The second group seems to be a dicot-exclusive group, since contains all annotated Arabidopsis PAL proteins and no monocot sequence. The third group, also composed exclusively of monocot sequences, included *So*PAL (GenBank: ABM63378.1), the unique sequence from *Saccharum* complex available in the GenBank, *Sh*PAL1 and *Sh*PAL4, which share 89% sequence identity. As expected, *Sh*PAL proteins always clustered together with sorghum PAL sequences, since sorghum is the closest relative species to sugarcane in the Andropogoneae tribe. Furthermore, we were unable to unambiguously determine the ortholog with other PAL proteins previously characterized in other plant species.

Genes belonging to the same phylogenetic group tend to display similar developmental expression profiles. *Sh*PAL1 showed higher relative expression in pith and rind when compared to the other sugarcane PAL genes in both cultivars (Figure 5A and B). In the rind of both cultivars, expression of *Sh*PAL1 and *Sh*PAL4 decreased with maturity, while the opposite was observed for *Sh*PAL2 and *Sh*PAL3 (Figure 5A and B). In the case of pith, more variation regarding expression profiles of each member was found, especially between the two cultivars. While expression of *Sh*PAL1 was stable throughout the maturation in IACSP04-683, transcript abundance increased from intermediary to mature pith samples in IACSP04-529. In IACSP04-529, *Sh*PAL4 expression decreased from young to intermediary pith, followed by an increase from intermediary to mature pith to recover the same levels of expression found in young pith, while in IACSP04-683 the opposite was observed. *Sh*PAL3 expression increased in mature pith of IACSP04-529, while in IACSP04-683 the transcript levels decreased with pith maturity. Finally, *Sh*PAL2 expression profile was similar in the pith of both cultivars, with higher levels of relative gene expression in young pith samples (Figure 5A and B).

Phylogeny and transcript abundance of C4H family: C4H belongs to the CYP73A group of the cytochrome P450 family and catalyzes the conversion of cinnamic acid to *p*-coumaric acid (Fraser and Chapple, 2011). Arabidopsis contains only one gene annotated as *C4H*, while maize contains two *C4H* genes (Raes et al., 2003; Riboulet et al., 2009). Two sugarcane SASs were identified coding for C4H (Figure S2). The C4H proteins also clustered into three groups. The first group was formed by sequences of both dicots and monocots, including *At*C4H from Arabidopsis, with only *Sh*C4H2 from sugarcane, which was closely related to *Zm*C4H2. The second group was formed only by two sorghum sequences. *Sh*C4H1 clustered in the third group, which also contains members of the CYP71 group of P450 family. Interestingly, sorghum seems to present no orthologous protein to *Sh*C4H2.

ShC4H1 showed higher relative expression in pith and rind compared to ShC4H2 gene in both cultivars (Figure 5C and D). In the cultivar IACSP04-529, ShC4H1 displayed the opposite expression profile in both pith and rind. In the cultivar IACSP04-683, the expression of ShC4H1 was always higher in young tissues. The rind of both cultivars displayed a decreased expression of ShC4H2 from young to intermediary stage followed by a recovery in mature of similar transcript levels in mature tissues. In IACSP04-529, ShC4H1 and ShC4H2 showed the same expression pattern, with a significant increase from intermediary to mature pith.

Phylogeny and transcript abundance of 4CL family: 4CL catalyzes the production of CoA esters of *p*-coumaric, caffeic, ferulic, 5-hydroxyferulic and sinapic acids. This is last enzymatic step common to all phenylpropanoid derivatives (i.e. formation of *p*-coumaroyl-CoA), including flavonoids, tannins, stilbenes and monolignols (Vogt, 2010). Arabidopsis genome is reported to have four *4CL* and nine *4CL-like* genes, while two *4CL* sequences were

found in maize (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). In sugarcane, three SASs were identified coding for 4CL proteins (Figure S3). The 4CL phylogenetic tree showed three groups. The first and widest group included monocot and dicot sequences clearly separated into distinct subgroups. This group includes *Sh*4CL1 and *Sh*4CL2, which share 87% sequence identity and cluster together with their respective orthologues in sorghum, as well as *At*4CL1 and *At*4CL2, the isoforms suggested to be involved in lignification in Arabidopsis according to Raes et al. (2003). The second group is formed exclusively by dicot sequences, including Arabidopsis *At*4CL3. The third group includes *Sh*4CL1 and *Os*4CL3, which down-regulation resulted in reduction of lignin in rice (Gui et al., 2011), and the fact that both *Sh*4CL1 and *Sh*4CL2 clustered together with Arabidopsis *At*4CL1 and *At*4CL2 suggest that these sugarcane homologues are the most qualified to play a role in lignification.

In both cultivars, *Sh*4CL2 was the most expressed 4CL gene in pith and rind, when compared to the other 4CL genes. However, the expression profile of *Sh*4CL2 was remarkably different between both cultivars (Figure 5E and F). In the cultivar IACSP04-683, *Sh*4CL2 expression decreases with maturity in pith and rind, while in cultivar IACSP04-529 there was an increase of transcript abundance in intermediary and mature rind and the recovery of expression levels in mature pith after significant decrease from young to intermediary stage (Figure 5E and F). In general, the expression profile of *Sh*4CL3 showed to be negatively related with maturity in both cultivars, in pith and rind, while *Sh*4CL1 showed a decrease from young to intermediary stage and tended to increase from intermediary to mature tissues in both cultivars.

Phylogeny and transcript abundance of HCT family: HCT is an acyltransferase and catalyzes the conversion of *p*-coumaroyl-CoA and caffeoyl-CoA to their corresponding shikimate and quinate esters (Fraser and Chapple, 2011). In addition, HCT also catalyzes the reverse transesterification reaction. Only one *HCT* gene is found in Arabidopsis genome, while maize presents two *HCT* genes (Raes et al., 2003; Riboulet et al., 2009). Similarly to Arabidopsis, only one SAS coding for HCT protein was identified in sugarcane (Figure S4). However, a HCT-like SAS was also found and used further. Phylogenetic analysis suggests that *bona fide* HCT proteins cluster into one well-defined group, while other more distant related HCT-like sequences cluster in a separate group.

ShHCT and ShHCT-like genes presented low expression levels in all analyzed tissue types and in both sugarcane cultivars. Interestingly, the relative expression of ShHCT-like gene was always higher than the *bona fide Sh*HCT (Figure 5G and H). In the cultivar IACSP04-683, ShHCT and ShHCT-like expression did not vary signicantly during rind and pith development, while in the cultivar IACSP04-529, the expression of ShHCT-like decreased from immature to intermediary stage and increased from intermediary to mature tissues, and ShHCT expression changed evidently only in the intermediary tissues with an increase in rind and decrease in pith.

Phylogeny and transcript abundance of C3H family: C3H, which belongs to the CYP98 subgroup, converts the shikimate/quinate esters of *p*-coumaric acid into their corresponding caffeic acid conjugates (Fraser and Chapple, 2011). Three *C3H* genes were identified in Arabidopsis genome and only one *C3H* gene was found in maize (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). In sugarcane, two SASs coding for C3H proteins were identified (Figure S5). C3H proteins clustered into three distinct phylogenetic groups. Both sugarcane

C3H sequences, *Sh*C3H1 and *Sh*C3H2, clustered into the first group, which seems to be a monocot-specific clade. On the other hand, the second group was formed exclusively by dicot sequences, including Arabidopsis *At*CYP98A3 that is functionally related to monolignol biosynthesis (Franke et al., 2002). *At*C3H2 and *At*C3H3 formed the third and highly divergent C3H subgroup. Similarly to PAL protein family, we were unable to unambiguously determine the ortholog of sugarcane C3H proteins with other previously characterized C3H in other plant species.

In both cultivars, *Sh*C3H1 was the most expressed C3H gene in pith and rind (Figure 5I and J). However, the two sugarcane cultivars presented different expression profile for each given gene. In IACSP04-529, the expression of the two genes increased with maturity in both pith and rind, while the opposite was observed for IACSP04-683.

Phylogeny and transcript abundance of CCoAOMT family: CCoAOMT plays a pivotal role in the determination of lignin composition, since it catalyzes the methylation of caffeoyl-CoA to feruloyl-CoA and also 5-hydroxyferuloyl-CoA to sinapoyl-CoA (Fraser and Chapple, 2011). Seven *CCoAOMT* members were identified in Arabidopsis and in maize a total of five *CCoAOMT* sequences were found (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). Three SASs were identified coding for CCoAOMT proteins in sugarcane (Figure S6). The phylogenetic tree for CCoAOMT proteins is composed of four distinct groups. The first group was formed exclusively by monocot sequences and contained *Sh*CCoAOMT2 and *Sh*CCoAOMT3. The second group was composed only of class II *Zm*CCoAOMT and its co-orthologue in sorghum *Sb*02g027930. The third group included both class I CCoAOMT from maize, *Sh*CCoAOMT1 and *At*CCoAOMT1, as well as other dicot and monocot sequences. Finally, the forth group was formed exclusively by the other Arabidopsis CCoAOMT proteins and might represent a dicot-specific clade. Based on phylogenetic relationships, *Sh*CCoAOMT1, which clustered together with lignin-related *At*CCoAOMT1 from Arabidopsis (Raes et al., 2003) and class I CCoAOMT from maize (Guillaumie et al., 2007), is the potential CCoAOMT isoform to be involved in lignification of sugarcane stem.

The expression profile of each *Sh*CCoAOMT gene was invariable from both developmental (i.e. comparing pith and rind) and genotypical (i.e. comparing cultivars) perspectives (Figure 5K and L). While expression of *Sh*CCoAOMT1 increased with maturity in pith and rind of both cultivars, the expression of *Sh*CCoAOMT2 and *Sh*CCoAOMT3 were higher in young tissues, decreasing with maturity. Interestingly, *Sh*CCoAOMT2 and *Sh*CCoAOMT3, which belong to the same phylogenetic group, also presented the same expression profile. Noteworthy, in young tissues, *Sh*CCoAOMT2 was the most expressed *CCoAOMT* gene, but *Sh*CCoAOMT1 became the most expressed *CCoAOMT* gene with stem maturation.

Phylogeny and transcript abundance of CCR family: CCR is responsible for the conversion of cinnamoyl-CoA esters to their corresponding cinnamyl aldehydes and is the first enzyme of the monolignol-specific pathway (Fraser and Chapple, 2011). Two *CCR* genes and five *CCR-like* genes were found in Arabidopsis, while three *CCR* genes and five *CCR-like* genes were identified in maize (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). In sugarcane, two SASs were identified as encoding CCR sequences (Figure S7). CCR proteins clustered into three distinct phylogenetic groups. First group contained *Sh*CCR1 and was separated into two subgroups, each one formed exclusively of dicot- and monocot-specific sequences, including the two *bona fide* CCR proteins from Arabidopsis. The second and third groups are both composed of monocot-specific sequences. The second sugarcane CCR protein, *Sh*CCR2, clustered in the

third group together with uncharacterized CCR proteins from monocot species and seems to belong to a more divergent clade within the family. Therefore, *Sh*CCR1 is closer to the sequences characterized as lignin involved in the literature.

*Sh*CCR1 showed higher relative expression in the pith of both sugarcane cultivars, while *Sh*CCR2 was the most expressed *CCR* gene in rind tissues (Figure 5M and N). *Sh*CCR1 expression was always higher in young tissues in both cultivars, except in the pith of IACSP04-529, in which the expression increased with maturation. Expression of *Sh*CCR2 was similar in pith and rind of IACSP04-529, with decreasing levels in mature tissues. In the case of IACSP04-683, *Sh*CCR2 expression levels were slightly higher in mature tissues when compared to young tissues, but intermediary tissues presented opposite expression levels.

Phylogeny and transcript abundance of F5H family: F5H belongs to the subgroup of CYP84 and catalyzes the 5-hydroxylation of coniferaldehyde and coniferyl alcohol to produce 5-hydroxyconiferaldehyde and 5-hydroxyconiferyl alcohol, respectively (Fraser and Chapple, 2011). F5H is a key enzyme for the production of lignin S unit. Two *F5H* genes were found in both Arabidopsis and maize genomes (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). Only one SAS encoding F5H was identified in sugarcane (Figure S8). The phylogeny tree for F5H indicates a clear separation into two groups: group 1 contains only monocots sequences, including *Sh*F5H1 and group 2 contains only dicot sequences. The predicted protein *Sh*F5H1 in sugarcane was strongly related to uncharacterized sorghum sequence *Sb*01g017270.1 (*Sb*CYP84A1), sharing 97% sequence identity.

The typical expression profile found for *Sh*F5H1 was a sharp up-regulation from young to intermediary tissues followed by an equally abrupt down-regulation from intermediary to mature tissues, in both sugarcane cultivars (Figure 5O and P). However, *Sh*F5H1 expression

showed a remarkable positive correlation with maturity during pith development in the cultivar IACSP04-529. The *Sh*F5H showed higher relative expression in pith comparing to rind.

Phylogeny and transcript abundance of COMT family: COMT catalyzes the methylation of 5-hydroxyconiferaldehyde and 5-hydroxyconiferyl alcohol to sinapaldehyde and sinapyl alcohol, respectively (Fraser and Chapple, 2011). Arabidopsis genome contains only one *bona fide COMT* gene and thirteen *COMT-like* genes, while maize presents one *COMT* gene and no reported *COMT-like* genes (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). In accordance to Arabidopsis and maize, only one SAS was identified coding for COMT protein in sugarcane (Figure S9). Phylogenetic analysis suggested a clear separation between *bona fide* COMT and COMT-like proteins.

The two analyzed sugarcane cultivars presented the same expression profile for *Sh*COMT1 gene. Transcript abundance was higher in young rind, decreasing in the transition from young to intermediary rind and slightly increasing in the transition from intermediary to mature rind. Similar expression levels were found in young and intermediary pith, with a sharp up-regulation in the final stage of pith development (Figure 5Q and R).

Phylogeny and transcript abundance of CAD family: CAD is the enzyme responsible for the last step in monolignol biosynthesis, which is the reduction of cinnamyl aldehydes into their respective alcohols (Fraser and Chapple, 2011). Arabidopsis genome contains nine *CAD* genes and maize presents six *CAD* genes (Raes et al., 2003; Guillaumie et al., 2007). In sugarcane, four SASs were identified as coding for CAD proteins (Figure S10). The CAD phylogenetic tree consisted in three major groups. First group contained two sugarcane CAD proteins,

*Sh*CAD7 and *Sh*CAD8, Arabidopsis *At*CAD2, *At*CAD3 and *At*CAD6 and several other monocot and dicot sequences. Second group also contained both dicot and monocot CAD sequences, including sugarcane *Sh*CAD6 and Arabidopsis *At*CAD1. The third group contained *Sh*CAD2, which seems to be the orthologue of *Sb*CAD2, the most likely CAD enzyme involved in lignification based on phylogenetic analysis (Saballos et al., 2009). In addition, this group also includes other closely related homologues in monocot species as well as *At*CAD4 and *At*CAD5, the two primary CAD proteins related to lignification in Arabidopsis. Thus, *Sh*CAD2 was the closest isoform to the sequences charcaterized as involved in lignification.

While *Sh*CAD2 showed higher relative expression in IACSP04-683 compared with the other genes of the same family (Figure 5T), highest expression was observed with *Sh*CAD8 in IACSP04-529 (Figure 5S), but both were similarly expressed in pith and rind. *Sh*CAD8 and *Sh*CAD2 were the second genes to be more expressed in IACSP04-683 and IACSP04-529, respectively (Figure 5S and T).







Figure 5. Expression profile of genes related with monolignol biosynthesis and retrieved from the SUCEST sugarcane database, based on the annotated genes from Arabidopsis, sorghum, rice and maize. Y = young internode, I = intermediary internode, M = mature internode, R = rind, P = pith. IACSP04-529 = high lignin content cultivar, IACSP04-683 = low lignin content cultivar.

Bayesian Network of the Lignin Biosynthesis Genes

In an attempt to get insights on the dependencies among all variables we have obtained, the expression data was integrated with the biochemical data (i.e. lignin quantification and composition and phenolic profiling) from the two sugarcane cultivars to construct two different regulatory networks. The first network (Figure 6A) included expression data, lignin content and S/G ratio of the samples of pith and rind of all internodes (young, intermediary and mature). In the second network (Figure 6B) the data of the intermediary internode was excluded and compounds identified in phenolic profiling were included in addition to the data mentioned above. Phenolic profiling was obtained only for young and mature internodes.

In the figure 6A the genes *Sh*HCT-like, *Sh*CCoAOMT1, and *Sh*CCR1 were intimately linked with S/G ratio. Curiously *Sh*C3H2 was only linked to IACSP04-529, indicating a very

specific relationship. Some genes were tipically separated in some tissues: *Sh*CAD6 in MR; *Sh*4CL2 and *Sh*CCR2 in IR; *Sh*CAD2 and *Sh*COMT1 in MP; *Sh*CCoAOMT3 in YP; *Sh*CAD7 in YR. Other genes linked different tissues and suggest a common role in these tissues. This was the case of *Sh*4CL3, *Sh*PAL1, *Sh*CAD8 and *Sh*C3H1. The network of figure 6A only identified positive correlations.

When data of the phenolic profiling was included in the analysis a more complex network was obtained and negative relationships were found (figure 6B). Tipically lignin precursors (caffeic acid, coumaric acid and ferulic acid) were not related with *Sh*HCT1, *Sh*PAL2, *Sh*4CL1, and *Sh*CAD7. Except for *Sh*CAD7, the other three genes were not displayed in the first network. On the other hand, lignin oligomers (lignols in Table 1) were positively related with several genes (*Sh*CAD2, *Sh*CAD8, *Sh*C4H2, *Sh*C3H1, *Sh*C3H2, *Sh*CCR1, and *Sh*COMT1). In a similar manner of the first network, YP was positively related with *Sh*4CL3, but negatively related with *Sh*CAD6 and *Sh*HCT-like. Curiously some genes were negatively correlated and separated by the sugarcane cultivars, as it was the case of *Sh*CAD7 and IACSP04-529, *Sh*C3H1 and IACSP04-683.



Figure 6. Networks produced by the Bayesian analysis using gene expression, lignin composition (S/G ratio) and lignin content data from different internodes and tissues (pith and rind) of the cultivars IACSP04-529 (high lignin) and IACSP04-683 (low lignin) (A) and using the data only for young and mature internodes plus phenolic profiling of young and mature internodes of the same cultivars (B).

DISCUSSION

The development of a new bioenergy industry based on lignocellulosic material will require considerable basic and applied efforts on methods for converting plant lignocellulose to fuels, because several and significant problems must be first overcome (Somerville, 2006). Among them, it should be highlighted the recalcitrance of cellulose because of its crystalline structure, the yeast incompatibility with fermentable sugars other than glucose, the toxicity of ethanol to microorganisms and the severe inhibition of the fermentation process caused by lignin (Somerville, 2006; Himmel et al., 2007). A growing number of biotechnological strategies to improve the efficiency and quality of commercially cell wall-derived products are being developed (Grima-Pettenati and Goffner, 1999; Waclawovsky et al., 2010). A greater understanding of the lignin biosynthesis/deposition may facilitate the development of significant biotechnology outcomes, especially for prominent bioenergy crops like sugarcane.

Here we present the first full systematic study of lignin deposition and gene expression analysis in two sugarcane cultivars with contrasting lignin content, named IACSP04-529 (higher lignin content) and IACSP04-683 (lower lignin content). Our choice for the two cultivars used in this study was based on three years evaluation of technological characteristics in a population produced by the breeding program of the Sugarcane Center of Agronomic Institute at Campinas (IAC). These cultivars had on average about 4.6% (IACSP04-683) and 8.43% (IACSP04-529) of lignin and although one may argue that such difference is only about 5%, they were consistent over the evaluation period.

Lignification process commences early in sugarcane stem development but is limited to vascular bundles in young internodes, while increase in maturity also lead to further deposition of lignin in other tissues such as epidermis, hypodermis and storage parenchyma (Jacobsen et al., 1992; Casu et al., 2007). The content of insoluble lignin, obtained by Klason method, showed a continuous increase until the 5th internode for IACSP04-683 and until the 6th internode for IACSP04-529. However, the lignin content remained practically unaltered from intermediary internodes throughout the maturation process in both sugarcane cultivars. In switchgrass, other prominent bioenergy grass (Schmer et al., 2008), the variation of lignin content was also lower among the internodes in later developmental stage when compared with younger (Shen et al., 2009). The accumulation of insoluble lignin in sugarcane seems to occur markedly in the first five internodes, in which the elongating process is still highly active (Lingle and Thomson, 2012) and might be associated with specific cell types that undergo lignification in early stages of stem development. Noteworthy, the first internodes in the apex, together with leaves, are discarded during the harvest since they have significant amounts of reducing sugars and, therefore, interefere with the ethanol yield (Ivin and Doyle, 1989). Therefore our lignin quantification data starting from the 5th internode to the botton of the stem are in good agreement with the results of the three-year evaluation, in which the top internodes of both cultivars were removed. The differences in magnitude found between our data and those for the previous evaluation are probably related with the method used in each case. For the three-year evaluation lignin contents were indirectly derived from the determination of acid and neutral detergent fibers (Van Soest, 1967), while in this study lignin was measured with Klason method, a classical method commonly used in wood research. In any case, determination of lignin content may vary significantly depending on the material and method used (Hatfield and Fukushima, 2005).

Histochemical analysis demonstrated that pith and rind are two distinct regions within the sugarcane stem. The rind is a highly active region for peroxidase activity and lignin deposition (Cesarino et al., 2012b), and a high percentage of vascular bundles are densely packed within this outermost part of the stem (see Figures 2A-C). Furthermore, as maturation proceeds, epidermis and hypodermis become highly lignified, increasing significantly the amount of lignin in the rind. Conversely, in the pith, vascular bundles are scattered in the storage parenchyma, in which some isolated cells remain not completely lignified after stem maturation (Jacobsen et al., 1992; Casu et al., 2007). The results of thioacidolysis showed that not only the lignin content but also lignin composition varies between these two anatomical regions of the sugarcane stem. Another outstanding conclusion was that lignin composition in rind and pith is temporally regulated. In the rind of both sugarcane cultivars there was a marked decrease in the S/G ratio in intermediary and mature tissues, indicating an increase in G-units content. Conversely, the S/G ratio in the pith regions increased during the stem maturation. The main contribution to the increase of S lignin in the intermediary and mature central regions is probably due to the lignification of parenchyma cells, which are higher in number than the vascular bundles, causing a dilution effect. The difference in lignin composition between pith and rind is remarkable because although lignin content is considered the major factor affecting cell wall recalcitrance, lignin composition and cross-linking to other cell wall components have been also related to cell wall degradability (Grabber, 2005). G-rich plants have a more highly cross-linked lignin while S-rich lignin is less condensed, since the presence of an additional methoxy group results in one less reactive site in the phenolic ring, reducing the number of possible combinations during polymerization. Consequently, S-rich lignin is more easily degraded than lignin rich in G-units (Ziebell et al., 2010).

Mechin et al. (2005) performed a combination of histological and biochemical studies to define a maize ideotype for cell wall digestibility as containing reduced amounts of lignin, higher levels of S-units and preferential localization of lignin in the rind. These authors suggested that a lesser lignification of the pith compared to the rind would favor cell wall degradability by increasing the accessible and potentially degradable area. Additionally,
Siqueira et al. (2011) observed that sugarcane pith samples were promptly hydrolyzed by cellulases, while the conversion of cellulose in rind samples was dependent on chlorite pretreatments. The significantly higher cell wall recalcitrance of sugarcane rind samples was mainly correlated to the higher lignin content due to the massive presence of lignin-rich fibers and vessels, but the presence of more condensed G-rich lignin in this anatomical region of the stem, as shown in this study, might also be implicated. Altogether, our data clearly show that not only lignin content but also lignin composition is spatially and temporally regulated in sugarcane, and significant differences can be found between different cell types within the same plant organ. Not less important, our data show that it seems to exist genetic variability for such S/G ratio since the pith of mature internodes of IACSP04-683 showed higher values than IACSP04-529.

We have applied LC-MS to analyze phenolic profiling and identified 35 compounds related to phenylpropanoid pathway and especially to lignin biosynthesis. Phenolic profiles were obtained for internodes at two different developmental stages for both cultivars and the differences among them were translated into clear separation of each sample on a PCA plot (Figure 4). Previous works on sugarcane metabolome were focused on primary metabolism related to sucrose accumulation (Glassop et al., 2007) or simple phenolic composition determination by comparing chromatographic profiles of sugarcane stem extracts with HPLC chromatograms of few known phenolic compounds (Duarte-Almeida et al., 2011). Studies aiming to determine the nutraceutical value of food derivatives from sugarcane demonstrated that the major flavonoids found in sugarcane tissues are flavones *O*- and *C*-glycosides, most of them being derivatives of apigenin, luteolin and tricin (Colombo et al., 2005, 2006). Our MS data corroborates these observations since all flavonoids identified in our data were tricin and tricin *O*-glycosides. However, it is important to note that flavonoids are more efficiently

detected in positive ion mode, while our analysis was carried out in negative ion mode, which could explain the limited variety and number of flavonoids found in all analyzed tissues and sugarcane cultivars. Duarte-Almeida et al. (2011) demonstrated that the predominant phenolics in internodes of three sugarcane varieties were the phenylpropanoids caffeic, chlorogenic and *p*-coumaric acids, while flavones appeared in lower amounts. In addition, phenolic profiles were different among internodes cultivars and between internodes samples and the derived sugarcane products raw juice, syrup, molasses, and VHP (Very High Polarisation) sugar. Indeed, comparison of relative abundances of identified phenolic compounds in our MS data showed that chlorogenic acids were the most abundant metabolites in both sugarcane cultivars, while hydroxycinnamates and flavonoids presented equivalent relative contents. Differential phenolic accumulation was also observed between the same tissue type of different sugarcane cultivars. Additionally, while Duarte-Almeida et al. (2011) could only detect ferulic acid in sugarcane by-products but not in sugarcane plant tissues, we could identify low amounts of ferulic acid in young and mature internodes of both cultivars, despite the fact that ferulic acid content was dramatically lower than caffeic and p-coumaric acids.

In agreement with the developmental program of lignin deposition in sugarcane stem, lignin intermediates and oligomers could be detected in both young and mature internode samples, while the differences were limited to relative abundance of each compound. Hydroxycinnamates and chlorogenic acids were normally detected in higher concentration in young internodes, which corroborates with their role as intermediates of lignin biosynthesis (Boerjan et al., 2003; Raes et al., 2003; Bonawitz and Chapple, 2010) while lignin oligomers clearly demonstrated a trend to differentially accumulate in mature internodes, which is in line with the higher deposition of lignin with increasing maturity. Interestingly, comparison of

relative abundance of the identified compounds between sugarcane cultivars showed that the content of nearly all of lignin oligomers was higher in cultivar IACSP04-529, which contained higher lignin content, while no obvious trend was observed for the other groups of identified compounds. However, a correlation between oligomers abundance and lignin deposition cannot be considered straightforward because lignin is likely to be produced by addition of monolignols to the growing polymer and not by the concatenation of preformed oligomers, since lignins contain relatively few cinnamoyl alcohol end groups (Morreel et al., 2004).

The identification of several lignin oligomers in a tissue that undergoes extensive lignification still suggests that these compounds are monolignol-coupling products formed under oxidative conditions and natural monolignol concentrations in the cell wall (Morreel et al., 2004). Recently, Kiyota et al. (2012) reported the analysis of soluble lignin in sugarcane by mass spectrometry using a "Do-it-Yourself" (DIY) library built with commercial enzymes and reagents. Despite the fact that their analysis was used to validate the DIY library, the lignin intermediates and oligomers found were different from the ones identified in the present study, which suggest that significant variation might be found when different plant cultivars/species or analytical methods is applied.

Grasses cell walls are different from dicot cell walls in terms of content and composition of polysaccharides, pectins, enzymatic and structural proteins and phenolic compounds (Vogel, 2008). Grass lignin also contains relatively higher amounts of H units (Grabber et al., 2004) and monolignol-hydroxycinnamates conjugates as primary building blocks (Ralph, 2010). Interestingly, lignin oligomers composed by H units were not found in our phenolic profiling data, what in part is in agreement with Kiyota et al. (2012), who found only the dimer G(8–5)H containing a H unit in sugarcane. In addition, several other oligomers easily detected in phenolic profiles of *Arabidopsis thaliana* stems (Vanholme et al., 2010) and

poplar xylem (Morreel et al., 2010) could not be detected in sugarcane stem samples. Due to the above mentioned differences between grass and dicots lignins, it is possible that sugarcane contains several oligomers composed by subunits and linkages not present in dicots plants and therefore not previously reported, despite of the variety of identified oligomers available for identification (Morreel et al., 2010; Morreel et al., 2010). Indeed, we observed several MS/MS chromatograms with fragmentation patterns similar to known lignin oligomers that could not be fully sequenced, suggesting the presence of unknown features in the structure of such putative oligomers, as also observed by others (E. Kiyota, A.C.H.F. Sawaya and P. Mazzafera, unpublished).

Additionally, several other metabolites such as coumarins, procyanidins, lignans, neolignans, flavonol glycosides and hydroxycinnamate esters conjugated with sugars, that were already recorded from previous works on phenolic profiling of *Arabidopsis* and poplar wild-type and mutant plants, were searched but not found, which is in line with the dramatic different phenolic metabolism of sugarcane compared to those model dicot plants. The fact that our in-house MS library based on data from *Arabidopsis* and poplar was not very efficient for identification of phenolic compounds in sugarcane stem highlights the importance of studies in a broad variety of plant species to fully understand lignin composition, polymerization and regulation.

The enzymes responsible for the sequential reactions of the monolignol biosynthesis pathway are normally encoded by multigene families in most dicots and monocots (Bonawitz and Chapple, 2010). However, different isoforms for a given enzyme may present specific kinetic properties and preferential expression in a particular organ or developmental stage, which results in differences in lignin amount and composition throughout the plant. Therefore, only a limited number of phenylpropanoid genes may play a role in constitutive lignification of sugarcane stem and consequently may have major effects in biomass recalcitrance. Here, a combination of phylogenetic and transcriptomic data was used to tentatively determine the member of each gene family that is most likely involved in monolignol biosynthesis in sugarcane stem, as well as in different anatomical regions within the internode (i.e. pith and rind).

Extensive analysis of Sugarcane EST Database identified several members for each phenylpropanoid gene family, with the exception of HCT, COMT and F5H that apparently are encoded by single genes. Nevertheless, since the searches for phenylpropanoid gene homologs in sugarcane were performed against an EST database instead of a full sequenced genome database, we cannot exclude the possibility of existence of additional members for each gene family. The determination of gene number within each family and their phylogenetic relationships has already been made in other pioneering studies in Arabidopsis (Raes et al., 2003), maize (Guillaumie et al., 2007) and poplar (Shi et al., 2010). Interestingly, while at least one single gene family was identified in most of the analyzed plant species so far, all phenylpropanoid families in *Populus trichocarpa* are multigenic, containing from three to twenty four members (Shi et al., 2010). However, since the parameters used for gene annotation varies from one study to another, the predicted number of genes for each function to a given plant species may also be variable (Guillaumie et al., 2007).

Riboulet et al. (2009) used the kinetics of phenylpropanoid gene expression during maize stem development and variation of lignin content to suggest the most likely genes to participate in the lignin biosynthesis route. Here, lignin increased in the older internodes and histochemical analysis showed that such increase occurred in the rind as well in the pith tissues. We also could see that, depending on the tissue, the S/G ratio changes, suggesting differences in the gene expression favouring the biosynthesis of G units (see discussion

above). The expression profile obtained (Figure 5) for both low and high lignin cultivars were similar for most of the genes and in several examples there was not a straight correlation between lignin content and expression. However, it is evident that some genes were more expressed than others independent of the internode position or tissue, as it was the case of ShPAL1, ShC4H1, Sh4CL2, ShHCT1-like and ShC3H1. On the other hand, two or more genes were similarly expressed depending on the cultivar, internode and tissue, such as ShCCoAOMT1 and ShCCoAOMT2; ShCCR1 and ShCCR2; ShCAD2, ShCAD6 and ShCAD8. But if one seeks for a correlation between increase in lignin and increases of gene expression taking in account both cultivars, internodes and tissues, only a few genes would be chosen. In this regard the network obtained using the Bayesian analysis might be useful indicating some potential genes to be used in studies aiming to obtain a genetically modified sugarcane with less or altered lignin composition, as it was the case of ShCCoAOMT1, ShCCR1 and ShHCTlike which were found to be positively related with S/G ratio. Other potential genes might be ShCAD2, ShCAD8, ShC4H2, ShC3H1, ShC3H2, ShCCR1 and ShCOMT1, which showed positive relation with lignin oligomers.

Many lignin biosynthetic genes showed similar expression patterns and transcript abundances within the gene family, suggesting functional redundancy. Interestingly, different expression profiles were found for some phenylpropanoid genes when comparing pith and rind, which also differed in lignin amount and composition. Noteworthy, S branch-specific genes (i.e. *F5H* and *COMT*) were up-regulated with maturity and normally presented higher relative expression in the pith, which is in agreement with thioacidolysis results showing an increased S/G ratio in intermediary and mature pith when compared to young tissues. Conversely, the same genes were down-regulated in rind samples, in which the maturation process favored the deposition of G-units. Finally, lower transcript levels for some family

members may be related with expressions in limited tissues or cell types, or their expression may be regulated by different environmental conditions.

The aim to separate rind from pith was a manner to get samples enriched with vascular bundles. The information on lignin content in these tissues together with the data obtained for lignin distribution in the internodes, the S/G ratio, and the expression profile showed us that we may try to change lignin content or composition in sugarcane by focusing on the peculiar caracteristics of these tissues regarding lignin (content and S and G composition) and the genes controlling its deposition.

Acknowledgments:

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – BIOEN 2008/58035-6). AB and IC thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil), and ABS and JCMSM thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) for doctorate fellowships. JLSM and PMN thank FAPESP for pos-doctoral fellowships. PM thank CNPq-Brazil for a research fellowship. The authors also thank Viviane Gabriela Santarosa, Kellen Cristine Hisatugo, Laerti Reis Roque and Eduardo Kiyota for technical assistance in several analyses carried out in this study and Veronique Storme for the assistance in statistic analysis. WB is supported by the Ghent University Multidisciplinary Research Partnership Biotechnology for a sustainable Economy.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl Acids Res 25: 3389-3402
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64: 5245-5250
- Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, Bidzinski P, Cezard L, Le Bris P, Borrega N, Herve J, Blondet E, Balzergue S, Lapierre C, Jouanin L (2011) Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. Plant Cell 23: 1124-1137
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. Annu Rev Plant Biol 54: 519-546
- **Bonawitz ND, Chapple C** (2010) The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. Annu Rev Genet **44**: 337-363
- Carroll A, Somerville C (2009) Cellulosic biofuels. Annu Rev Plant Biol 60: 165-182
- **Casu RE, Dimmock CM, Chapman SC, Grof CP, McIntyre CL, Bonnett GD, Manners JM** (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
- **Casu RE, Jarmey JM, Bonnett GD, Manners JM** (2007) Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. Funct Integr Genomics **7:** 153-167
- **Cesarino I, Araújo P, Domingues Júnior AP, Mazzafera P** (2012a) An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. Braz J Bot **35:** 303-311
- Cesarino I, Araújo P, Mayer JLS, Paes Leme AF, Mazzafera P (2012b) Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. Plant Physiol Biochem
- **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
- Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HM, Arruda P, Bespalhok Filho JC, Burnquist WL, Creste S, di Ciero L, Ferro JA, de Oliveira Figueira AV, de Sousa Filgueiras T, Grossi-de-Sa MD, Guzzo EC, Hoffmann HP, de Andrade Landell MG, Macedo N, Matsuoka S, de Castro Reinach F, Romano E, da Silva WJ, de Castro Silva Filho M, Cesar Ulian E (2011) Sugarcane (*Saccharum* X *officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. Trop Plant Biol **4**: 62-89
- Chen F, Dixon RA (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. Nat Biotechnol 25: 759-761
- Colombo R, Yariwake JH, Queiroz EF, Ndjoko K, Hostettmann K (2005) On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 1082: 51-59
- Colombo R, Yariwake JH, Queiroz EF, Ndjoko K, Hostettmann K (2006) On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (Saccharum officinarum L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. Phytochem Anal 17: 337-343
- **Creste S, Pinto LR, Xavier MA, Landell MGA** (2010) A importância do germoplasma no desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar com perfil agroenergético. Luis Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. 1 ed. São Paulo: Blucher: 313-317
- Dias MO, Junqueira TL, Cavalett O, Cunha MP, Jesus CD, Rossell CE, Maciel Filho R, Bonomi A (2012) Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. Bioresour Technol 103: 152-161

- **Dias MOS, Ensinas AV, Nebra SA, Maciel R, Rossell CEV, Maciel MRW** (2009) Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. Chem Eng Res Des **87:** 1206-1216
- Duarte-Almeida JM, Salatino A, Genovese MI, Lajolo FM (2011) Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. Food Chemistry 125: 660-664
- Ferrer JL, Austin MB, Stewart C, Jr., Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiol Biochem 46: 356-370
- **Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM, Chapple C** (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. Plant J **30:** 47-59
- **Fraser CM, Chapple C** (2011) The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. The Arabidopsis Book: e0152
- Fu C, Mielenz JR, Xiao X, Ge Y, Hamilton CY, Rodriguez M, Chen F, Foston M, Ragauskas A, Bouton J, Dixon RA, Wang Z-Y (2011) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. Proc Natl Acad Sci USA 108: 3803-3808
- Gerlach G (1969) Botanische Mikrotechnik, eine linfuhrung. Georg Thieme, Stuttgard
- **Glassop D, Roessner U, Bacic A, Bonnett GD** (2007) Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? Plant Cell Physiol **48**: 573-584
- **Godfrey N** (2011) Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models. Plant Sci **181:** 379-386
- Goldemberg J (2007) Ethanol for a sustainable energy future. Science 315: 808-810
- **Grabber JH** (2005) How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. Crop Sci **45**: 820-831
- Grabber JH, Ralph J, Lapierre C, Barriere Y (2004) Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. C R Biol **327**: 455-465
- Gray J, Caparrós-Ruiz D, Grotewold E (2012) Grass phenylpropanoids: Regulate before using! Plant Sci 184: 112-120
- Grima-Pettenati J, Goffner D (1999) Lignin genetic engineering revisited. Plant Sci 145: 51-65
- Grunewald W, De Smet I, Lewis DR, Lofke C, Jansen L, Goeminne G, Vanden Bossche R, Karimi M, De Rybel B, Vanholme B, Teichmann T, Boerjan W, Van Montagu MC, Gheysen G, Muday GK, Friml J, Beeckman T (2012) Transcription factor WRKY23 assists auxin distribution patterns during Arabidopsis root development through local control on flavonol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 109: 1554-1559
- Gui J, Shen J, Li L (2011) Functional characterization of evolutionarily divergent 4coumarate:coenzyme A ligases in rice. Plant Physiol 157: 574-586
- Guillaumie S, San-Clemente H, Deswarte C, Martinez Y, Lapierre C, Murigneux A, Barrière Y, Pichon M, Goffner D (2007) MAIZEWALL. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize. Plant Physiol **143**: 339-363
- **Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O** (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol **59:** 307-321
- Hatfield R, Fukushima RS (2005) Can lignin be accurately measured? Crop Sci 45: 832-839
- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. Science 315: 804-807
- Ivin PC, Doyle CD (1989) Some measurements of the effects of tops and trash on cane quality. In: Australian Society of Sugar Cane, 11. Proceedings: 169-177
- Jacobsen KR, Fisher DG, Maretzki A, Moore PH (1992) Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. Bot Acta 105: 70-80
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. New York; McGraw-Hill Company Inc.

- **Katajamaa M, Oresic M** (2005) Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. BMC Bioinformatics **6:** 179
- Katoh K, Kuma K-i, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Res 33: 511-518
- **Kiyota E, Mazzafera P, Sawaya ACHF** (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 MGA, Campana MP, Rodrigues AA (2002) A variedade IAC 86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. Boletim Técnico IAC 193, Campinas: Instituto Agronômico de Campinas: 36
- Lange BM, Lapierre C, Sandermann Jr H (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin (structural similarity to early developmental lignins). Plant Physiol 108: 1277-1287
- Lapierre C, Pollet B, Monties B (1991) Thioacidolysis of spruce lignin: GC-MS analysis of the main dimers recovered after raney nickel desulphuration. Holzforschung: 61-68
- Li X, Weng JK, Chapple C (2008) Improvement of biomass through lignin modification. Plant J 54: 569-581
- Lingle SE, Thomson JL (2012) Sugarcane internode composition during crop development. BioEnergy Res 5: 168-178
- Lisboa CC, Butterbach-Bahl K, Mauder M, Kiese R (2011) Bioethanol production from sugarcane and emissions of greenhouse gases known and unknowns. Global Change Biology Bioenergy 3: 277-292
- **Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods **25**: 402-408
- Méchin V, Argillier O, Rocher F, Hebert Y, Mila I, Pollet B, Barriere Y, Lapierre C (2005) In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. J Agric Food Chem 53: 5872-5881
- 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, Kim H, Lu FC, Dima O, Akiyama T, Vanholme R, Niculaes C, Goeminne G, Inze D, Messens E, Ralph J, Boerjan W (2010) Mass spectrometry-based fragmentation as an identification tool in lignomics. Anal Chem 82: 8095-8105
- Morreel K, Ralph J, Kim H, Lu F, 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 JCMS, Bonine CAV, Viana JDF, Dornelas MC, Mazzafera P (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. J Integr Plant Biol **52**: 360-376
- Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZ, Felix JM, Branco DS, Waclawovsky AJ, Del Bem LE, Lembke CG, Costa MD, Nishiyama MY, Jr., Vicentini R, Vincentz MG, Ulian EC, Menossi M, Souza GM (2009) Sugarcane genes associated with sucrose content. BMC Genomics 10: 120
- Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZ, Oliveira KC, Felix Jde M, Vicentini R, Rocha Cde S, Simoes AC, Ulian EC, di Mauro SM, da Silva AM, Pereira CA, Menossi M, Souza GM (2005) Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. DNA Res 12: 27-38
- **Rabelo SC, Carrere H, Maciel Filho R, Costa AC** (2011) Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. Bioresour Technol **102**: 7887-7895
- **Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W** (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. Plant Physiol **133**: 1051-1071
- Ralph J (2010) Hydroxycinnamates in lignification. Phytochem Rev 9: 65-83
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett **339**: 62-66

- Riboulet C, Guillaumie S, Mechin V, Bosio M, Pichon M, Goffner D, Lapierre C, Pollet B, Lefevre B, Martinant JP, Barriere Y (2009) Kinetics of phenylpropanoid gene expression in maize growing internodes: relationships with cell wall deposition. Crop Sci 49: 211-223
- Saballos A, Ejeta G, Sanchez E, Kang C, Vermerris W (2009) A genomewide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench] identifies SbCAD2 as the Brown midrib6 gene. Genetics 181: 783-795
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425
- Schmer MR, Vogel KP, Mitchell RB, Perrin RK (2008) Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. Proc Natl Acad Sci USA 105: 464-469
- Shen H, Fu C, Xiao X, Ray T, Tang Y, Wang Z, Chen F (2009) Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety alamo and the effects on saccharification efficiency. BioEnergy Res 2: 233-245
- Shi R, Sun Y-H, Li Q, Heber S, Sederoff R, Chiang VL (2010) Towards a systems approach for lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes. Plant Cell Physiol 51: 144-163
- Simmons BA, Loque D, Ralph J (2010) Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. Curr Opin Plant Biol 13: 313-320
- Siqueira G, Milagres AMF, 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: 1-9
- Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27: 431-432
- Somerville C (2006) The billion-ton biofuels vision. Science 312: 1277-1277
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol
- Van Soest PJ (1967) Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. J Anim Sci 26: 119-120
- Van Soest PJ (1994) In: Nutritional ecology of ruminants. Cornell University Press
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiol 153: 895-905
- Vanholme R, Ralph J, Akiyama T, Lu F, Pazo JR, Kim H, Christensen JH, Van Reusel B, Storme V, De Rycke R, Rohde A, Morreel K, Boerjan W (2010) Engineering traditional monolignols out of lignin by concomitant up-regulation of F5H1 and down-regulation of COMT in Arabidopsis. Plant J 64: 885-897
- Vanholme R, Storme V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K, Boerjan W (2012) A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. Plant Cell
- Vanholme R, Van Acker R, Boerjan W (2010) Potential of *Arabidopsis* systems biology to advance the biofuel field. Trends Biotechnol 28: 543-547
- Vega-Sanchez ME, Ronald PC (2010) Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement. Curr Opin Biotechnol 21: 218-224
- Vogel J (2008) Unique aspects of the grass cell wall. Curr Opin Plant Biol 11: 301-307
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. Mol Plant 3: 2-20
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH, Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. Plant Biotechnol J 8: 263-276
- Weng JK, Chapple C (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. New Phytol 187: 273-285
- Weng JK, Li X, Bonawitz ND, Chapple C (2008) Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. Curr Opin Biotechnol 19: 166-172

- Wilczynski B, Dojer N (2009) BNFinder: exact and efficient method for learning Bayesian networks. Bioinformatics 25: 286-287
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN, Jr. (2008) Plants to power: bioenergy to fuel the future. Trends Plant Sci 13: 421-429
- **Zhao Q, Dixon RA** (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? Trends Plant Sci **16**: 227-233
- Ziebell A, Gracom K, Katahira R, Chen F, Pu Y, Ragauskas A, Dixon RA, Davis M (2010) Increase in 4-coumaryl alcohol units during lignification in alfalfa (*Medicago sativa*) alters the extractability and molecular weight of lignin. J Biol Chem **285**: 38961-38968

SUPPLEMENTARY DATA

Figures S1-S10. Phylogenetic analysis of amino acid sequences of monolignol biosynthesis enzymes retrieved from NCBI, TAIR, Uniprot and MAIZEWALL databases and the identified homologs in sugarcane.

Figure S1 - PAL



Figure S2 – C4H





Figure S4 – HCT



Figure S5 – C3H



Figure S6 – CCoAOMT





Figure S8 – F5H





Figure S10 – CAD



Gene	SAS	SAS Primers Pairs	
ShPAL1	SCCCLR1048D07.g	5′- AGGAGGAGAAGAGGAGGAAAATAC - 3′ 5′- AGAAGAAAGAACAACGCCACA - 3′	150
ShPAL2	SCEQRT1024E12.g	5′- TCCCACAAAGCCAAAGC - 3′ 5′- ACACAGATGAGAGGAACAACG - 3′	179
ShPAL3	SCJLRT1013C01.g	5'- CTACCCGCTCTACCGCTTC - 3' 5'- TCCCTATGCGTTTTTCTGTTC - 3'	200
ShPAL4	SCJFLR1017B11.g	5´- CAAGAGGCAAGAGGAGGAG - 3´ 5´- AGCAAGGTAAGAACAAACAGACA - 3´	200
ShC4H1	SCCCCL4009H01.g	5′- CCGCAGATCCAGCACTATG - 3′ 5′- ATCCAACACCATTCCTCAGC - 3′	148
ShC4H2	SCJFRZ2030D03.g SCRLAD1140C06.g	5′- ATCGTGAATGCTTGGGCTCT - 3′ 5′- CTTGTTCCTGGGCAAATCCT - 3′	170
Sh4CL1	SCCCCL3002A03.g	5′- AGCCGTTCCAGGTCAAGTC - 3′ 5′- CTCGGGGTCGTTCAGGTAA - 3′	161
Sh4CL2	SCVPLB1015F12.g	5′- CACACTGGGGACATTGGTT - 3′ 5′- CATTGAGACAACAGCAGCATC - 3′	162
Sh4CL3	SCMCRT2102F02.g	5′- TGATCCTGCTCCAGAACTCC - 3′ 5′- GACTGGGTGACGATGAGCTT - 3′	154
ShHCT1	SCCCCL4009E02.g	5´- AGCACAGAGAAGCGGAGAAG - 3´ 5´- AAAGGGGGCAAGCAGAAA - 3´	151
ShHCT-like	SCVPRT2082B07.g	5′- GCAGGTGGTAGAGTCGTCGT - 3′ 5′- ATGAGGTCCAGGGGAGAGAG - 3′	81
ShC3H1	SCVPCL6041E07.g	5′- TCACTGCTGGAATGGACACA - 3′ 5′- TGTAGGTAGGGGGGGGGTTCTGG - 3′	163
ShC3H2	SCQSRT1036E09.g	5´- CCGGTCTCGTCACCTTCA - 3´ 5´- CAACAGCATCAGCTTCCAAA - 3´	155
ShCYP75B4	SCSFRT2067G11.g	5´- ACTTCGTCGCCAAGGACAT - 3´ 5´- TCAGAGATGACCCACTCCACT - 3´	160
ShCCoAOMT1	SCAGCL6012G12.g SCCCLR1069B09.g SCCCLR1079A02.g SCRUFL4024C06.b	5´- GACGCCGACAAGGACAAC - 3´ 5´- CACGAAGTCGCGGTAGAAG - 3´	162
ShCCoAOMT2	SCJLRT2050C09.g	5′- TTGCTGCTGCGTAATCCTC - 3′ 5′- GCGGATGGAAAGARAGAAAA - 3′	117
ShCCoAOMT3	SCJFRZ2010H06.g	5′- CAGGACCAGTGCCAACATC - 3′ 5′- TTTCAGCGTCTCTTTCATTACTTG - 3′	157
ShCCR1	SCCCRZ2C01A04.g SCBFRT1064A01.g	5´- GCTGGTCGGTCTCTTATCATC - 3´ 5´- CTGACGGTTCCCTTGACAG - 3´	214
ShCCR2	SCCCCL6024F07.g SCVPCL6064C01.g	5´- GAGGGTGAAGGTGAGTGAAGG - 3´ 5´- CAACCGAGGGAGGTGGAG - 3´	211
ShF5H1	SCJLRT1022E04.g	5´- GCACTACGGTCCCTTCTGG - 3´ 5´- TCACGTTCTTGGTCAGGTTG - 3´	194
ShCOMT1	SCRFLR1012F12.g SCJLRT1023B09.g	5´- GAGGACAAGGACGGCAAGT - 3´ 5´- AGTACCAGCTCTCCATGAGGAC - 3´	139
ShCAD2	SCBFAM2021E08.g SCEPRZ1011A02.g	5´- CCCCTACACCTACACCCTCA - 3´ 5´- CACCTCACCGACCACCTC - 3´	157
ShCAD8	SCEQLR1029E05.g	5´- ACGGCTGGAGAAGAACGAC - 3´ 5´- GCAAAGCACCAACTCATCAA - 3´	154
ShCAD7	SCCCLB1001F10.g	5´- CTGCCTTCTCTTTGGTTGCT - 3´ 5´- TACCTGACCTCGCCCTTG - 3´	181
ShCAD6	SCACHR1038E08.g	5´- AGCACCGACCAGAAGCAG - 3´ 5´- AAAGATGAGCGGGAACGAC - 3´	177

Table S1. Gene names, SAS identification, primers, and size of amplicons used for RT-qPCR analysis.

PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarated: CoA ligase; HCT, p-hydroxy cinnamoyl-CoA: shikimate/quinate p-hydroxy cinnamoyl transferase; C3H, cinnamate 3-hydroxylase or pcoumaroylshikimic acid/quinic acid 3-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl

coenzyme A *O*-methyltransferase; CCR, cinnamoyl coenzyme A reductase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; COMT, caffeic acid *O*-methyltransferase; CAD, cinnamyl alcoholdehydrogenase.

Samples	µmol/g dry wt			
IACSP04-529	S/G ² ratio	G	S	Total
YR^1	2.13	38	81	119
YP	1.85	22	42	64
IR	0.31	375	117	492
IP	3.22	93	301	394
MR	0.46	349	160	509
MP	3.61	104	376	480
IACSP04-683	S/G ratio	G	S	Total
YR	1.61	16	26	42
YP	1.34	59	79	138
IR	0.74	107	79	186
IP	3.83	70	267	337
MR	0.85	189	160	348
MP	4.40	109	480	589

Table S2. Monomeric composition of lignin determined by thioacidolysis.

¹ YR = rind of young internode, YP = pith of young internode, IR = rind of intermediary internode, IP = pith of intermediary internode, MR = rind of mature internode, MP = pith of mature internode. ² S = syringyl and G = guaiacyl; S/G = ratio of G to S lignin units.

Data are the means of three independent replicates.

Table S3. Values of the RT-qPCR expression analysis of 29 lignin biosynthesis-related genes in different regions from cultivars IACSP04-529 and IACSP04-683. Numbers in blue indicate the highest values observed for each gene. Results expressed as mean of three independent replicates, and each replicate had three technical replicates.

GeneMeanP valueYR 1 IRMRYPIPMPShPAL1< 0.00011.4234b0.3141/ ⁴⁶ 0.1708c1.0545/ ⁴⁵ 0.8174 ^{cd} 2.5628°ShPAL2< 0.00010.0214 ^a 0.0555 ^a 0.0569 ^a 0.003 ⁴⁶ 0.00171 ^a 0.0133 ^a ShPAL3< 0.00010.11362 ^{bb} 0.0431b ⁶ 0.0123 ⁴ 0.003 ⁴⁶ 0.0023 ⁴⁶ 0.0023 ⁴⁶ ShPAL4< 0.00010.1356 ^{bb} 0.0417 ⁴⁵ 0.024 ^{4b} 0.0126 ^{bb} 0.1141 ^{cb} 0.0737 ^{cb} 0.3985 ^a ShC4H1< 0.00010.0454 ^{bb} 0.029 ^{2b} 0.0494 ^{bb} 0.0156 ^{cb} 0.1029 ^{cb} 0.1046 ^{cb} Sh4CL10.01010.0035 ^{cb} 0.1402 ^{ab} 0.1026 ^{bb} 0.103 ^{bb} 0.0002 ^{bb} 0.0009 ^{bb} Sh4CL2< 0.00010.0035 ^{cb} 0.1402 ^{ab} 0.1026 ^{bb} 0.103 ^{bb} 0.0003 ^{bb} 0.0008 ^{bb} Sh4CT-Tike< 0.00010.0007 ^{bb} 0.0003 ^{ab} 0.0001 ^{bb} 0.0000 ^{bb} 0.0000 ^{bb} 0.0000 ^{bb} Sh2G3H2< 0.00010.0037 ^{4bc} 0.027 ^{cb} 0.0470 ^{bb} 0.0166 ^{db} 0.0005 ^{bb} 0.0002 ^{bb} ShCCAADMT1< 0.00010.0037 ^{cbc} 0.0027 ^{bb} 0.0002 ^{bb} 0.0000 ^{cb} 0.00005 ^{bb} 0.0002 ^{bb} ShCCAADMT2< 0.00010.0037 ^{cbc} 0.0017 ^{bb} 0.016 ^{db} 0.00005 ^{cb} 0.0022 ^{bb} ShCCADADMT2< 0.00010.0007 ^{bb} 0.0002 ^{bb} 0.00005 ^{cb} 0.0002 ^{cb} ShCCADMT30.01930.0007 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0	IACSP04-529							
P valueYR1IRMRYPIPMP $ShPAL1^2$ < 0.00011.4234 ^b 0.3141 ^{de} 0.0708°1.0545 ^b °0.569 ^a 0.0171°0.0133 ^a $ShPAL3$ < 0.00010.0107°0.0243 ^b 0.0561 ^a 0.003 ^{de} 0.0023 ^c 0.0081 rd $ShPAL4$ < 0.00010.1362 ^{ab} 0.0431 ^{bc} 0.0124 ^c 0.157 ^a 0.0411 ^{bc} 0.107 ^{bh} $ShC4H1$ < 0.00010.1436 ^{cb} 0.0124 ^c 0.155 ^c 0.0129 ^c 0.1046 ^h $ShC4H2$ < 0.00010.0454 ^b 0.029 ^c 0.0494 ^{bh} 0.0156 ^{cb} 0.0129 ^c 0.1046 ^h $Sh4CL2$ < 0.00010.0355 ^{cs} 0.1402 ^a 0.1026 ^b 0.1014 ^{cb} 0.0094 ^b $Sh4CL3$ 0.00770.0027 ^{bb} 0.0036 ^a 0.0016 ^{bc} 0.0018 ^{cc} 0.0003 ^{bb} 0.0008 ^{cb} $Sh4CL1$ 0.00040.0007 ^{bb} 0.0002 ^{bb} 0.0002 ^{bb} 0.0003 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} $Sh4CL3$ 0.00070.0003 ^{cd} 0.0016 ^{bc} 0.0018 ^{cc} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} $Sh4CL1$ 0.00010.0337 ^{bb} 0.0016 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} $Sh4CL3$ 0.00010.0337 ^{bb} 0.001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} $Sh4CL3$ 0.00010.0337 ^{bb} 0.001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} $Sh4CL2$ < 0.00010.0337 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} 0.0001 ^{bb} $ShC2N1$ < 0.00010.0337 ^{cb} 0.00	Gene	Mean						
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$		P value	YR ¹	IR	MR	ҮР	IP	MP
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$ShPAL1^2$	< 0.0001	1.4234 ^b	0.3141 ^{de}	0.1708 ^e	1.0545 ^{bc}	0.8174 ^{cd}	2.5628 ^a
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	ShPAL2	< 0.0001	0.0214^{a}	0.0555^{a}	0.0569^{a}	0.0696^{a}	0.0171^{a}	0.0133 ^a
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	ShPAL3	< 0.0001	0.0107°	0.0243 ^b	0.0561 ^a	0.003 ^{de}	0.0023 ^e	0.0081 ^{cd}
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	ShPAL4	< 0.0001	0.1362 ^{ab}	0.0431 ^{bc}	0.0124°	0.157^{a}	0.0411^{bc}	0.107^{ab}
$ \begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	ShC4H1	< 0.0001	0.1439 ^c	0.4171^{a}	0.2881 ^b	0.1141 ^c	0.0737 ^c	0.3985 ^a
	ShC4H2	< 0.0001	0.0454^{b}	0.029°	0.0494^{b}	0.0156°	0.0129°	0.1046^{a}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	Sh4CL1	0.0124	0.007^{ab}	0.0033 ^b	0.0063^{ab}	0.0056^{ab}	0.0023^{b}	0.0099^{a}
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Sh4CL2	< 0.0001	0.0355°	0.1402^{a}	0.1026^{b}	0.103^{b}	0.0114°	0.0946^{b}
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	Sh4CL3	0.0075	0.0027^{ab}	0.0036 ^a	0.0016^{bc}	0.0018 ^{ac}	0.0009 ^c	0.0008 ^c
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShHCT-like	< 0.0001	0.0003 ^b	0.0002^{b}	0.0002^{b}	0.0004^{b}	0.0003^{b}	0.0035^{a}
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	ShHCT1	0.0004	0.00007^{b}	0.00033 ^a	0.0001^{b}	0.00002^{b}	0.00001 ^b	0.00001 ^b
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShC3H1	< 0.0001	$0.0374^{\rm bc}$	0.027°	0.0470^{b}	0.0166^{d}	0.0047^{d}	0.1005 ^a
$\begin{array}{c ccccc} ShCYP75B4 & < 0.0001 & 0.0005^{c} & 0.00078^{c} & 0.0021^{a} & 0.00009^{c} & 0.00005^{c} & 0.00022^{b} \\ ShCCoAOMT1 & < 0.0001 & 0.1288^{bc} & 0.0541^{c} & 0.2474^{b} & 0.1738^{bc} & 0.2838^{b} & 0.8180^{a} \\ ShCCoAOMT2 & < 0.0001 & 0.4508^{a} & 0.0136^{c} & 0.0026^{c} & 0.4754^{a} & 0.1723^{b} & 0.0335^{c} \\ ShCCoAOMT3 & 0.0193 & 0.00034^{ab} & 0.00016^{ab} & 0.0002^{b} & 0.00082^{a} & 0.0006^{ab} & 0.0002^{ab} \\ ShCCR1 & < 0.0001 & 0.007^{b} & 0.0007^{b} & 0.0004^{b} & 0.0014^{b} & 0.0009^{b} & 0.0004^{a} \\ ShCCR2 & < 0.0001 & 0.0012^{ab} & 0.0023^{a} & 0.0002^{b} & 0.0008^{b} & 0.0004^{b} & 0.0001^{b} \\ ShF5H1 & 0.0275 & 0.00054^{b} & 0.00091^{b} & 0.00031^{b} & 0.00078^{b} & 0.000257^{a} & 0.000405^{a} \\ ShCAD2 & < 0.0001 & 0.0118^{b} & 0.007^{b} & 0.0009^{b} & 0.0018^{b} & 0.0003^{b} & 0.00025^{a} \\ ShCAD6 & < 0.0001 & 0.0018^{b} & 0.0007^{b} & 0.0009^{b} & 0.0018^{b} & 0.0003^{b} & 0.0006^{b} \\ ShCAD7 & < 0.0001 & 0.0025^{b} & 0.019^{a} & 0.0072^{b} & 0.0012^{b} & 0.0003^{b} & 0.0003^{b} \\ ShCAD8 & < 0.0001 & 0.0026^{b} & 0.019^{a} & 0.0072^{b} & 0.0012^{b} & 0.0008^{b} & 0.0003^{b} \\ ShCAD8 & < 0.0001 & 0.0026^{b} & 0.019^{a} & 0.0072^{b} & 0.0012^{b} & 0.0012^{b} & 0.0003^{b} \\ ShPAL1 & < 0.0001 & 0.0026^{b} & 0.019^{a} & 0.0072^{b} & 0.0012^{b} & 0.0012^{b} & 0.003^{b} \\ ShPAL2 & 0.0001 & 0.0046^{b} & 0.0029^{bc} & 0.0073^{a} & 0.0023^{cd} & 0.001^{d} & 0.0004^{d} \\ ShPAL3 & < 0.0001 & 0.0351^{c} & 0.666^{c} & 0.1357^{a} & 0.1078^{a} & 0.042^{a} & 0.0757^{a} \\ ShC4H2 & < 0.0001 & 0.0877^{b} & 0.04156^{cd} & 0.073^{a} & 0.023^{cd} & 0.013^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H1 & < 0.0001 & 0.0877^{b} & 0.04156^{cd} & 0.023^{b} & 0.0281^{b} & 0.013^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H1 & < 0.0001 & 0.0351^{c} & 0.0652^{b} & 0.017^{d} & 0.0237^{cd} & 0.1038^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H1 & < 0.0001 & 0.0351^{c} & 0.0652^{b} & 0.017^{d} & 0.0237^{cd} & 0.1038^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H2 & < 0.0001 & 0.0351^{c} & 0.0652^{b} & 0.0017^{d} & 0.0237^{cd} & 0.1038^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H1 & < 0.0001 & 0.0351^{c} & 0.0035^{c}$	ShC3H2	< 0.0001	0.00306 ^{cd}	0.01558 ^a	0.01214^{ab}	0.00117^{d}	0.00151 ^{cd}	0.00864^{bc}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCYP75B4	< 0.0001	0.00057°	0.00078°	0.00321^{a}	0.00009°	0.00005°	0.00222^{b}
$ \begin{array}{c ccccc} ShCcoAOMT2 < 0.0001 & 0.4508^{a} & 0.0136^{c} & 0.0026^{c} & 0.4754^{a} & 0.1723^{b} & 0.0335^{c} \\ ShCcoAOMT3 & 0.0193 & 0.0003^{ab} & 0.00016^{ab} & 0.0002^{b} & 0.00082^{a} & 0.0006^{ab} & 0.0002^{ab} \\ ShCCR1 & < 0.0001 & 0.0007^{b} & 0.0007^{b} & 0.0004^{b} & 0.0014^{b} & 0.0009^{b} & 0.0041^{a} \\ ShCCR2 & < 0.0001 & 0.0012^{ab} & 0.0023^{a} & 0.0002^{b} & 0.0008^{b} & 0.0004^{b} & 0.0014^{a} \\ ShCOMT1 & < 0.0001 & 0.1114^{b} & 0.0165^{d} & 0.0194^{cd} & 0.0471^{cd} & 0.0555^{c} & 0.4027^{a} \\ ShCAD2 & < 0.0001 & 0.0018^{b} & 0.0007^{b} & 0.0009^{b} & 0.0018^{b} & 0.0003^{b} & 0.0003^{b} & 0.00025^{b} \\ ShCAD2 & < 0.0001 & 0.0018^{b} & 0.0007^{b} & 0.00062^{a} & 0.0003^{b} & 0.0003^{b} & 0.0003^{b} & 0.00065^{b} & 0.00006^{b} \\ ShCAD7 & < 0.0001 & 0.00238^{a} & 0.00015^{b} & 0.0007^{b} & 0.00012^{b} & 0.0002^{b} & 0.0003^{b} & 0.0003^{b} \\ ShCAD8 & < 0.0001 & 0.0026^{b} & 0.019^{a} & 0.0072^{b} & 0.0012^{b} & 0.0002^{b} & 0.0003^{b} \\ ShPAL1 & < 0.0001 & 0.4573^{c} & 0.5007^{c} & 0.1286^{d} & 2.2934^{a} & 1.9679^{ab} & 1.8375^{b} \\ ShPAL2 & 0.0034 & 0.1483^{a} & 0.0666^{a} & 0.1357^{a} & 0.1078^{a} & 0.042^{a} & 0.0757^{a} \\ ShPAL3 & < 0.0001 & 0.00351^{c} & 0.0652^{b} & 0.0017^{d} & 0.0237^{cd} & 0.0138^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H1 & < 0.0001 & 0.0351^{c} & 0.0652^{b} & 0.0017^{d} & 0.0237^{cd} & 0.1038^{a} & 0.0079^{cd} \\ ShC4H1 & < 0.0001 & 0.0877^{b} & 0.04156^{cd} & 0.079^{bc} & 0.1298^{a} & 0.0303^{d} & 0.0301^{d} \\ ShC4H2 & < 0.0001 & 0.0877^{b} & 0.04156^{cd} & 0.079^{bc} & 0.1298^{a} & 0.0303^{d} & 0.0301^{d} \\ ShC4H2 & < 0.0001 & 0.0877^{b} & 0.0035^{c} & 0.0253^{b} & 0.0281^{b} & 0.0173^{b} & 0.0183^{b} \\ ShC4H2 & < 0.0001 & 0.045^{a} & 0.0035^{c} & 0.0253^{b} & 0.0281^{b} & 0.0173^{b} & 0.0183^{b} \\ Sh4CL2 & < 0.0001 & 0.0351^{a} & 0.0030^{a} & 0.0004^{b} & 0.0035^{a} & 0.0005^{b} & 0.0003^{b} \\ Sh4CL2 & < 0.0001 & 0.035^{a} & 0.0030^{a} & 0.0004^{b} & 0.0035^{a} & 0.0005^{b} & 0.0003^{b} \\ ShHCT-like & 0.0002 & 0.0001^{b} & 0.0002^{ab} & 0.0001^{b} & 0.0002^{ab} & 0.0003^{b} \\ $	ShCCoAOMT1	< 0.0001	0.1288^{bc}	0.0541°	0.2474^{b}	0.1738^{bc}	0.2838^{b}	0.8180^{a}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCCoAOMT2	< 0.0001	0.4508^{a}	0.0136°	0.0026°	0.4754^{a}	0.1723 ^b	0.0335°
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCCoAOMT3	0.0193	0.00034^{ab}	0.00016^{ab}	0.0002^{b}	0.00082^{a}	0.0006^{ab}	0.0002^{ab}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCCR1	< 0.0001	0.0007^{b}	0.0007^{b}	0.0004^{b}	0.0014^{b}	0.0009 ^b	0.0001^{a}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCCR2	< 0.0001	0.0007^{ab}	0.0007^{a}	0.0002^{b}	0.0008^{b}	0.0004^{b}	0.0001^{b}
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShE5H1	0.0275	0.0012	0.00025 0.000091 ^b	0.0002	0.0000	0.0001^{a}	0.0001^{a}
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShCOMT1	< 0.0001	0.1114^{b}	0.0000001	0.0194^{cd}	0.0471^{cd}	0.0565°	0.4027^{a}
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShCAD2	< 0.0001	0.0018^{b}	0.0102^{b}	0.0009 ^b	0.0018^{b}	0.0003 ^b	0.0142^{a}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCAD6	< 0.0001	0.0010	0.0007^{b}	0.0009	0.0010	0.00005 ^b	0.00006^{b}
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ShCAD7	< 0.0001	0.00238^{a}	0.00015^{b}	0.00002^{b}	0.00002^{b}	0.00008 ^b	0.00003 ^b
Normal biologyNormal biologyNormal biologyIACSP04-683GeneMeanP valueYRIRMRYPIPMPShPAL1< 0.0001	ShCAD8	< 0.0001	0.00250	0.019^{a}	0.0072^{b}	0.00012^{b}	0.0012^{b}	0.0158 ^a
GeneMeanP valueYRIRMRYPIPMPShPAL1< 0.0001 0.4573^{c} 0.5007^{c} 0.1286^{d} 2.2934^{a} 1.9679^{ab} 1.8375^{b} ShPAL2 $0,0034$ 0.1483^{a} 0.0666^{a} 0.1357^{a} 0.1078^{a} 0.042^{a} 0.0757^{a} ShPAL3< 0.0001 0.0046^{b} 0.0029^{bc} 0.0073^{a} 0.0023^{cd} 0.001^{d} 0.0004^{d} ShPAL4< 0.0001 0.0351^{c} 0.0652^{b} 0.0017^{d} 0.0237^{cd} 0.1038^{a} 0.0079^{cd} ShC4H1< 0.0001 0.0877^{b} 0.04156^{cd} 0.079^{bc} 0.1298^{a} 0.0303^{d} 0.0301^{d} ShC4H2< 0.0001 0.045^{a} 0.0035^{c} 0.0253^{b} 0.0281^{b} 0.0173^{bc} 0.0183^{bc} Sh4CL1 $0,0023$ 0.0140^{a} 0.0034^{c} 0.0044^{bc} 0.0119^{ab} 0.008^{ac} 0.0079^{ac} Sh4CL2< 0.0001 0.1391^{a} 0.1119^{b} 0.0535^{cd} 0.0733^{c} 0.0468^{cd} 0.033^{d} Sh4CL3< 0.0001 0.0035^{a} 0.0003^{b} 0.0005^{b} 0.0003^{b} 0.0005^{b} 0.0003^{a}	IACSP04-683	010001	0.0020	01017	0.0072	0.0012	0.0012	0.0100
P valueYRIRMRYPIPMPShPAL1< 0.0001 0.4573^{c} 0.5007^{c} 0.1286^{d} 2.2934^{a} 1.9679^{ab} 1.8375^{b} ShPAL2 $0,0034$ 0.1483^{a} 0.0666^{a} 0.1357^{a} 0.1078^{a} 0.042^{a} 0.0757^{a} ShPAL3< 0.0001 0.0046^{b} 0.0029^{bc} 0.0073^{a} 0.0023^{cd} 0.001^{d} 0.0004^{d} ShPAL4< 0.0001 0.0351^{c} 0.0652^{b} 0.0017^{d} 0.0237^{cd} 0.1038^{a} 0.0079^{cd} ShC4H1< 0.0001 0.0877^{b} 0.04156^{cd} 0.079^{bc} 0.1298^{a} 0.0303^{d} 0.0301^{d} ShC4H2< 0.0001 0.045^{a} 0.0035^{c} 0.0253^{b} 0.0281^{b} 0.0173^{bc} 0.0183^{bc} Sh4CL1 $0,0023$ 0.0140^{a} 0.0034^{c} 0.0044^{bc} 0.0119^{ab} 0.008^{ac} 0.0079^{ac} Sh4CL2< 0.0001 0.1391^{a} 0.1119^{b} 0.0535^{cd} 0.0733^{c} 0.0468^{cd} 0.033^{d} Sh4CL3< 0.0001 0.0035^{a} 0.0003^{b} 0.0005^{b} 0.0003^{b} 0.0003^{b} 0.0002^{ab} </th <th>Gene</th> <th>Mean</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th>	Gene	Mean						
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		P value	VR	IR	MR	VP	IP	МР
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShPAL1	< 0.0001	0.4573°	0.5007°	0.1286 ^d	2 2934 ^a	1 9679 ^{ab}	1.8375 ^b
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShPAL2	0.0034	0.1373^{a}	0.0666 ^a	0.1200 0.1357^{a}	0.1078^{a}	0.042^{a}	0.0757 ^a
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	ShPAL3	< 0.0001	0.0046^{b}	0.0029^{bc}	0.0073^{a}	0.0023^{cd}	0.012	0.0004^{d}
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShPAL4	< 0.0001	0.0351°	0.062^{b}	0.0013^{d}	0.0023	0.001	0.0079^{cd}
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShC4H1	< 0.0001	0.0877 ^b	0.0032	0.0017	0.1298 ^a	0.0303 ^d	0.0301^{d}
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	ShC4H2	< 0.0001	0.0077	0.0035°	0.075^{b}	0.0281^{b}	0.0303^{bc}	0.0183^{bc}
$Sh4CL2$ < 0.0001 0.1391^{a} 0.1119^{b} 0.0535^{cd} 0.0733^{c} 0.0468^{cd} 0.033^{d} $Sh4CL3$ < 0.0001	Sh4CL1	0.0023	0.013^{a}	0.0035°	0.0233 0.0044^{bc}	0.0201	0.0175	0.0109^{ac}
$Sh4CL3$ < 0.0001	Sh4CL2	< 0.0001	0.1391 ^a	0.00001	0.0535 ^{cd}	0.0733°	0.000	0.033 ^d
ShHCT-like 0.0002 0.0001^{b} 0.0002^{ab} 0.0001^{b} 0.0002^{ab} 0.0002^{ab} 0.0002^{ab} 0.0003^{a}	Sh4CL3	< 0.0001	0.0035^{a}	0.0030^{a}	0.0008 ^b	0.0735 ^a	0.0400 0.0005 ^b	0.0003 ^b
511101 11002 0.0002 0.0001 0.0002 0.0002 0.0002 0.0002	ShHCT_like	0.0002	0.00000 0.0001 ^b	0.0002^{ab}	0.0000	0.0002^{ab}	0.0002^{ab}	0.0003^{a}
$S_{b}HCT1 = 0.0011 = 0.00005^{ab} = 0.00002^{abc} = 0.00001^{bc} = 0.00006^{a} = 0.000038^{abc} = 0.00001^{c}$	ShHCT1	0.0011	0.0001^{ab}	0.0002	0.0001^{bc}	0.0002 0.00006ª	0.0002	0.00001°
$S_{k}C_{3}H_{1} = \langle 0.0001 0.0312^{ab} 0.0038^{d} 0.0153^{cd} 0.0339^{a} 0.0198^{bc} 0.0074^{cd}$	ShC3H1	< 0.0001	0.0312^{ab}	0.00002	0.0153^{cd}	0.0330^{a}	0.0198^{bc}	0.0074^{cd}
$S_{k}C_{3}H^{2}$ 0.0001 0.0012 0.0006 0.0005 0.0005 0.0005 0.0000 0.00074	ShC3H2	0.0033	0.0512 0.006736 ^a	0.0036	0.0100 0.00093 ^b	0.00000 0.00130 ^b	0.0190	0.0074 0.00006°
$S_{k}CYP75B4 \leq 0.0001 + 0.00144^{b} + 0.00013^{b} + 0.00075^{a} + 0.00024^{b} + 0.00005^{b} + 0.00005^{b}$	ShCVP75B4	< 0.0001	0.000750	0.00200	0.00075	0.0013°	0.00004	0.00000
$ShC_{co}\Delta OMT1 \le 0.0001 + 0.000144 + 0.00015 + 0.000157 + 0.000024 + 0.00005 + 0.0005 + 0$	ShC 11 / 5D4 $ShC co \Delta OMT1$	< 0.0001	0.00144 0.0489 ^b	0.00015	0.0137 0.1014^{b}	0.00024 0.1071^{b}	0.00005	0.00005 0.2844 ^a
$ShCcoAOMT2 < 0.0001 0.23^{b} 0.0507^{c} 0.0053^{c} 1.0854^{a} 0.257^{b} 0.1535^{bc}$	$ShCco\DeltaOMT2$	< 0.0001	0.273 ^b	0.077°	0.0053°	1 9854 ^a	0.257 ^b	0.1535 ^{bc}
$ShCcoAOMT3 = 0.0176 = 0.00019^{a} = 0.0007 = 0.0003^{b} = 0.00019^{a} = 0.00012^{b} $	$ShCco\DeltaOMT2$	0.0176	0.275	0.00007 ^b	0.00000 0.00001 ^b	0.0008^{ab}	0.207	0.00003 ^b
$ShCCR1 = 0.0005 = 0.0007^{ab} = 0.0005^{b} = 0.0007^{b} = 0.00008 = 0.00000 = 0.00005^{b}$	ShCCR1	0.0005	0.0001^{3}	0.00002	0.00001	0.00000000000000000000000000000000000	0.00000	0.00003
$ShCCR2 \le 0.0001 + 0.0007 + 0.0002 + 0.0014 + 0.0014 + 0.0004 + 0$	ShCCR?	< 0.0000	0.0007	0.0101 ^a	0.0002	0.0014	0.0010	0.0004
<i>Sh</i> E5H1 0.0011 0.000016 ^b 0.000111 ^b 0.000028 ^b 0.00045 ^b 0.000542 ^a 0.00096 ^b	ShF5H1	0.0011	0.000016 ^b	0.000111^{b}	0.000028^{b}	0.000045 ^b	0.000542^{a}	0.000096 ^b

ShCOMT1	< 0.0001	0.0235 ^{bc}	0.0118 ^c	0.0165 ^c	0.0633 ^b	0.0581 ^{bc}	0.1815^{a}
ShCAD2	0,2772	0.0012 ^a	0.0019^{a}	0.0028^{a}	0.0018^{a}	0.0014^{a}	0.0034^{a}
ShCAD6	< 0.0001	0.00003^{b}	0.0001 ^b	0.00099^{a}	0.00001^{b}	0.00004^{b}	0.00001^{b}
ShCAD7	0,00300	0.0012^{ab}	0.00143^{ab}	0.00029^{b}	0.0017^{a}	0.00013 ^b	0.00021^{b}
ShCAD8	0,002	0.0008^{b}	0.0006^{b}	0.0004^{b}	0.0014^{ab}	0.0029^{a}	0.0015^{ab}

¹ YR = rind of young internode, YP = pith of young internode, IR = rind of intermediary internode, IP = pith of mature internode, MR = rind of mature internode, MP = pith of mature internode.² The gene names are as described in Table 1.

^a Within a line, numbers with the same letter are not significantly different based on Tukey test (P \leq 0.05) from one-way analysis of variance (ANOVA). The expression of each gene was normalized with the *GAPDH*.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE URÉIA E DA BAIXA LUMINOSIDADE NA BIOSSÍNTESE DA LIGNINA EM CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA EM ESTUFA

2. INTRODUÇÃO

2.1. Nitrogênio

O nitrogênio (N) constitui aproximadamente 2% do peso seco e cerca de16% das proteínas totais das plantas. Trata-se de um componente essencial, constituinte de moléculas essenciais às plantas, como proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos, clorofilas, alguns hormônios e cofatores, entre outras (Stitt and Krapp, 1999; Scheible et al., 2004; Peng et al., 2007). A baixa disponibilidade de N reduz significantemente a capacidade fotossintética e pode deixar as plantas mais susceptíveis a possíveis danos oxidativos causados pelo excesso de luz. Dessa forma, uma estratégia para se adaptar a condições de limitação de N é aumentar a síntese de antocianinas, que elimina as moléculas reativas de oxigênio, protegendo as células contra danos oxidativos (Stitt and Krapp, 1999; Diaz et al., 2006; Peng et al., 2007). Estima-se que atualmente as plantações são fertilizadas com cerca de 80 a 90 milhões de toneladas de N anualmente no mundo, e esse valor pode crescer para 240 milhões em 50 anos (Peng et al., 2007). Entretanto, menos da metade desse N é realmente utilizado pelas plantas, sendo o restante lixiviado para águas subterrâneas ou perdido para a atmosfera por volatilização, podendo resultar em danos ambientais e certamente aumentando os custos da produção agrícola (Peng et al., 2007).

O N tem efeito dramático no crescimento e arquitetura das plantas. As mudanças no crescimento são influenciadas pela expressão diferenciada de uma miríade de genes, que modulam a utilização de vários recursos. As variações na expressão de genes podem influenciar a maneira em que as fontes de carbono (C) e N serão alocadas entre as partes das plantas e como serão particionadas nas vias bioquímicas. O transporte via floema é uma importante maneira de alocar diversos nutrientes entre as partes das plantas, incluindo compostos nitrogenados (Cooke et al., 2003).

O C e o N possuem um metabolismo altamente interligado. O N inorgânico é requerido para que os carboidratos sejam utilizados no crescimento vegetal (Stitt, 1999; Fritz et al., 2006). Nos tecidos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, a quebra de carboidratos fornece redutores equivalentes, ATP e esqueletos de C, que auxiliam na assimilação de N inorgânico e na síntese de metabólitos contendo N, como aminoácidos e nucleotídeos (Fritz et al., 2006). Em plantas com limitação de N, a maioria dos carboidratos acumulam na forma de amido, e os aminoácidos e açúcares solúveis diminuem (Fritz et al., 2006). A fertilização com nitrato, além de resultar em aumento nos níveis de ácidos orgânicos e diminuição do amido, pode provocar mudanças nos níveis de hormônios, na estrutura radicular, atraso no florescimento e senescência (Stitt, 1999).

O impacto da queda no suprimento de N na lignificação tem sido melhor documentado em gramíneas forrageiras, devido ao seu valor nutricional. Na maioria dos casos, há um aumento no conteúdo de lignina com a fertilização com N, o que é atribuído a uma estimulação na síntese do aminoácido fenilalanina (Phe). Entretanto, altas concentrações de N também podem promover crescimento de novos brotos que são pobres em lignina, compensando o alto conteúdo de lignina em outros tecidos (Pitre et al., 2007). Em plantas de tabaco, foi observado que a deficiência de N resulta em grandes mudanças no metabolismo secundário, incluindo aumento nos níveis de muitos derivados da via dos fenilpropanóides, como ácidos clorogênicos (CGA), rutina e lignina (Fritz et al., 2006). Em *Arabidopsis*, a baixa disponibilidade de N resulta em aumento na síntese de antocianinas e estimula a expressão de alguns genes envolvidos na via dos fenilpropanóides (Peng et al., 2007).

O estágio de desenvolvimento presente no momento da fertilização com N, a espécie analisada e a forma de aplicação de N também podem modular as respostas das plantas ao nutriente. Em folhas de plântulas de pinus, a fertilização com N reduz o conteúdo de lignina nas raízes, mas não tem efeito na parte aérea. Em pinus vermelho, a combinação de nitrogênio-fosforo-potássio (NPK) resulta em diminuição na concentração de lignina nos ramos e tem efeito contrário no tronco principal em plantas com 41 anos de idade (Pitre et al., 2007).

Para que a cana-de-açúcar tenha altas taxas de crescimento e acúmulo de biomassa, aplicações substanciais de N são requeridas, principalmente quando os resíduos agrícolas são queimados após a colheita e pouco N retorna ao solo. Essa alta taxa de fertilização representa um alto custo de produção, sendo necessário garantir que o uso do N seja eficiente e a safra seja rentável (Van der Laan et al., 2011). Algumas análises em folhas indicam que a deficiência de N tem papel fundamental na redução da produção de cana. Entretanto, o uso excessivo e a fertilização em tempo inapropriado podem resultar em deterioração da qualidade da água, do solo local e do ar (Robinson et al., 2011; Van der Laan et al., 2011).

A uréia tem papel importante na agricultura e é o fertilizante nitrogenado mais utilizado mundialmente, devido ao alto conteúdo de N e baixo custo de produção (http://www.fertilizer.org/ifa), sendo intensivamente explorado, por exemplo, na Ásia, para o cultivo do arroz (Kojima et al., 2006; Cao et al., 2010). O N presente na uréia geralmente atinge a planta na forma de amônio ou nitrato, pois o fertilizante já é degradado por ureases microbianas. Alternativamente, as plantas também podem absorver a uréia diretamente, convertendo-a em amônia antes do N ser assimilado (Cao et al., 2010; Polacco et al., 2013).

Cerca de 20 a 65% do N fertilizado nas plantações de cana são perdidos no solo e essas perdas ocorrem principalmente devido à lixiviação do nitrato, volatilização da amônia e emissões gasosas através da conversão microbiológica do amônio e do nitrato (Robinson et al., 2011). Na tabela 1, pode-se observar a produtividade e a quantidade de N utilizado na fertilização da cana-de-açúcar, nos 14 principais países produtores de cana-de-açúcar. No Brasil, a cana-de-açúcar produz grandes quantidades de colmos com quantidades moderadas de adubação nitrogenada. Isso se deve à presença de fixação biológica de N na cultura, que contribui com até 210 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N (Vitti et al., 2008). As bactérias fixadoras encontradas na cana-de-açúcar são classificadas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* spp., *Herbaspirillum* e *Herbaspirillum* spp. e estão presentes em qualquer órgão da planta. Algumas variedades de cana podem obter até 60% do N necessário por meio dessas bactérias. Além de aumentar o crescimento devido à fixação de N, outros fatores estimulantes do crescimento, como o hormônio ácido indolacético, são produzidos por essas bactérias (Lee et al., 2000; Vitti et al., 2008; Taule et al., 2012).

Tabela 1. Produtividade da cana-de-açúcar e fertilização com N nos 14 principais países produtores, responsáveis por aproximadamente 84% da área de produção e 86% da produção de cana-de-açúcar no mundo. Tabela adaptada de Robinson *et al.* (2011).

Country	Area ^a (ha)	Production ^a (Tg)	N applied ^b (Gg)	N Removal ^c (Gg)	Output Input Ratio	Reported N application rates (kg N ha ⁻¹)
1. Brazil	8 141 135	649	613	389	0.6	60-100 ¹
2. India	5 055 200	348	732	209	0.3	150-400 ²
3. China	1 708 520	125	512	75	0.1	100-755 ³
4. Thailand	1 054 439	74	44	44	1.0	
5. Pakistan	1 241 300	64	231	38	0.2	120-180 ⁴
6. Mexico	669 231	51	70	30	0.4	
7. Colombia	383 388	39	n/a	23		
8. Australia	390 000	34	70	20	0.3	160 ⁵
9. Argentina	355 000	30	25	18	0.7	
10. USA	374 200	28	40*	17	0.4	78-146 ⁶ , 247-280 ⁷
11. Philippines	397 991	27	11	16	1.4	
12. Indonesia	415 578	26	52	16	0.3	125 ⁴
13. Guatemala	287 000	25	n/a	15		
14. South Africa	425 000	21	57	12	0.2	60-200 ⁴
Total	20 897982	1 541	2 457	922	0.47 [†]	

2.2. Luminosidade

Embora a luz seja essencial para a fotossíntese, e dessa forma crucial para a sobrevivência das plantas, ela também pode causar estresse oxidativo. A exposição das plantas à luz excessiva, excedendo o que é utilizado fotoquimicamente, resulta na inativação das funções fotossintéticas e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no cloroplasto,

como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais superóxido (O₂ $\dot{}$) e hidroxila (OH), e oxigênio *singlet* (Rossel et al., 2002). Entretanto, as plantas desenvolveram uma variedade de estratégias para proteger suas células, incluindo a síntese de peroxidases, acúmulo de antocianinas, redução dos componentes da antena, além do desenvolvimento de sistemas que dissipam a energia luminosa absorvida (Kimura et al., 2003). O aumento na síntese de antocianinas pode ser observado frequentemente em plantas expostas a diversos estresses além da alta luminosidade como, por exemplo, temperaturas extremas, radiação ultravioleta, seca e deficiência nutricional (Zeng et al., 2010).

Segundo Kimura *et al.* (2003), além de enzimas sequestradoras de EROs e envolvidas na síntese de antocianinas, a alta incidência luminosa também ativa a expressão dos genes da via de biossíntese de lignina em *Arabidopsis*. Evidências sugerem que a produção de H_2O_2 na parede celular está associada a muitos eventos fisiológicos, como morte celular programada, lignificação, enrijecimento de parede e defesa celular (Su et al., 2005). Em hipocótilos de soja submetidos à alta luminosidade, observou-se estímulo da síntese de lignina e aumento na produção de H_2O_2 na parede, em plantas com atividades elevadas de peroxidases e poliamina oxidases. As poliamina oxidases possuem papel importante na produção de H_2O_2 *in vivo*, que será utilizado pelas peroxidases para aumentar a rigidez da parede, durante o crescimento e diferenciação celular (Su et al., 2005). Além das peroxidades e poliamina oxidases, outras enzimas estão envolvidas na produção de H_2O_2 na parede celular, como amina oxidases contendo Cu, oxalato oxidases e NADPH oxidases localizadas na membrana plasmática (Karkonen et al., 2009)

Em culturas de calos de *Pinus radiata* foi observado que a luz aumenta a diferenciação dos elementos traqueais (ETs), ocorrendo um crescimento de 20 e 40% na diferenciação dos ETs crescidos com um fotoperíodo de 16 e 24 horas, respectivamente (Möller et al., 2006).

Möller *et al.* (2006) observaram em calos tratados com fotoperíodo de 16 horas estímulo na atividade das enzimas PAL e CAD, a primeira e a última enzima da biossíntese de lignina, respectivamente, além de acúmulo de lignina. Em *Phaseolus radiata*, os tratamentos com fotoperíodos de 24 e 48 horas resultaram em aumento de 10 e 34% no conteúdo de lignina, respectivamente, devido ao aumento na atividade de peroxidases e lacases (Chen et al., 2002).

2.3. Objetivos – Capítulo 2

O principal objetivo do Capítulo 2 foi analisar em duas variedades de cana-de-açúcar, IACSP04-065 e IACSP04-627, contrastantes para o conteúdo de lignina, os efeitos dos tratamentos com duas concentrações de uréia (17 g ou 150 g de N por planta) e redução da incidência luminosa (50% da luminosidade solar incidente), na deposição de lignina.

Para atingir tais metas, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Análise do nível dos transcritos dos genes envolvidos na biossíntese da lignina, baseando-se no padrão de expressão observado para o material analisado no Capítulo 1;

2. Mensuração do conteúdo total e composição da lignina em regiões imaturas e maduras do colmo;

3. Analisar o perfil dos metabólitos primários nesses materiais.

2.4. Material e Métodos

2.4.1. Material Biológico e Condições de Tratamento

Dois materiais contrastantes para o conteúdo lignina foram selecionados para o cultivo em casa de vegetação: IACSP04-627 e IACSP04-065, com alto (8,12%) e baixo (4,32%) teor de lignina, respectivamente. Estes dois materiais foram obtidos no Centro de Cana do IAC e os valores de lignina foram obtidos por análises em três anos consecutivos.

As plantas foram cultivados em solo em caixas d'água de 1.000 L e submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de N na forma de uréia (0 g – controle; 17 g e 150 g de N por planta) e diferentes intensidades de luz (100 e 50% da luminosidade solar). O plantio foi feito em Janeiro de 2010 e os tratamentos se iniciaram em Setembro do mesmo ano. O tratamento com N foi realizado em dois períodos, sendo metade do montante aplicado em Setembro/2010 e a outra metade em Outubro/2010. O tratamento com luz foi aplicado durante três meses (Setembro a Novembro de 2010). Os colmos das regiões superior (região imatura, ápice) e média (região madura, base) foram coletados e separados em casca e miolo (Figura 1; Cesarino et al., 2012). Logo após a divisão do material, as amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

Resumidamente, o delineamento experimental foi o seguinte: quatro tratamentos, sendo um deles considerado controle (C; sem aplicação de uréia e recebendo 100% de luminosidade solar), plantas tratadas com uma menor dose de uréia (N1), plantas tratadas com uma maior dose de uréia (N2) e plantas tratadas com 50% de incidência luminosa (RL).

A separação do entrenó em casca e miolo foi realizada para a maioria das análises, pois as camadas mais externas do colmo (epiderme e hipoderme) se tornam mais lignificadas, além de possuírem uma quantidade significativamente maior de feixes vasculares. Cerca de 75% dos feixes vasculares estão densamente depositados nos 3 mm mais externos do colmo, sendo
a casca provavelmente metabolicamente mais ativa para a deposição de lignina. Já na região central do colmo, os feixes vasculares estão dispostos de forma menos concentrada e muitas de suas células não se apresentam lignificadas. Além disso, os feixes vasculares presentes na casca apresentam uma bainha de esclerênquima maior em comparação com os feixes situados na região central (Cesarino et al., 2012).

Para facilitar a leitura do texto daqui em diante adotaremos a seguinte nomenclatura: YR = Young Rind (casca jovem); YP = Young Pith (miolo jovem); MR = Mature Rind (casca madura); e MP = Mature Pith (miolo maduro);



Figura 5. A. Entrenós da cana-de-açúcar em dois estágios diferentes de desenvolvimento. Nas análises foram utilizados o estágio maduro (superior) e imaturo (inferior). **B.** Separação dos entrenós em região externa (*rind*) e interna (*pith*) (modificado de Cesarino et al., 2012)

2.4.2. Dados Biométricos

Durante a coleta do material foram obtidos alguns dados biométricos: altura das plantas (do solo até o ápice do primeiro entrenó), a massa fresca total da matéria das plantas e das folhas separadamente, o diâmetro dos entrenós e o número de folhas verdes.

2.4.3. Trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram realizadas com um analisador de gases por infravermelho – IRGA (ADC BioScientific LCpro+ System). Foi controlada a quantidade de luz (1000 μ mol m⁻²s⁻¹) utilizada. A temperatura média das folhas foi de 29,24°C (±0,99°C). Foram realizadas, em média, três medidas por folha de ambos os genótipos, utilizando três folhas diferentes. Foram eliminados os maiores e menores valores obtidos para cada parâmetro analisado, a fim de se manter um conjunto mais homogêneo, permanecendo, assim, sete medidas por genótipo *versus* tratamento.

2.4.4. Avaliação de Açúcares Solúveis

Amostras liofilizadas e moídas em N₂ líquido da parte central (miolo) da cana-deaçúcar foram extraídas com água destilada (10 mg/ml, 1h a 50°C), centrifugadas a 12.000xg por 10 min e o teor de sacarose, glicose e frutose foram feitas em cromatógrafo Shimadzu equipado com sistema de bombas LC-10 Ai e injetor automático. Estas amostras foram analisadas com detector eletroquímico (400 mV) e a coluna utilizada foi Dionex CarboPacTM PA1 (4 x 250 mm) e uma pré-coluna Dionex CarboPacTM PA1 (4 x 50 mm). Foram injetados 2 μ L de amostra e o fluxo utilizado foi de 1,2 mL/min. As fases móveis utilizadas foram água (A) e NaOH 200 mM (B), sendo que a concentração de NaOH durante os 15 minutos da corrida foi de 40 mM. O programa utilizado para detectar e calcular a área dos picos foi o CLASS-VP. Para cálculo de concentrações foram utilizados padrões de glicose, frutose e sacarose (Sigma).

2.4.5. Dosagens de Lignina

2.4.5.1. Ácido Tioglicólico (TGA)

A dosagem foi realizada de acordo com Barber e Ride (1988): 0,3 g de material liofilizado e macerado em N_2 líquido foram homogeneizados em 1,5 mL de etanol (99,5%), permanecendo em sonicador por 10 min e posteriormente foi centrifugado a 12.000xg por 15

min. Em seguida, o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e centrifugado a 12.000xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 65°C overnight. Foram pesados 15 mg do material seco e adicionados 0,2 mL de ácido tioglicólico (98%) e 1,0 mL de HCL (2 mol/L). Essa mistura foi homogeneizada e levada ao banho-úmido a aproximadamente 100°C por 4 h. Logo após, a mistura foi resfriada em gelo e permaneceu em câmara fria por 4 h. Após centrifugação a 12.000xg por 10 min o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e centrifugado novamente a 12.000xg por 10 min, sendo solubilizado em 1,5 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹). Essa mistura ficou sob constante agitação (150 rpm) por 12 h na temperatura ambiente, para depois ser centrifugada a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 µl de HCl concentrado e o tubo permaneceu em câmera fria por 4 h. Finalmente, o material foi centrifugado a 10.000xg por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹). A lignina obtida por ácido tioglicólico teve sua absorbância lida em 280 nm e a concentração expressa em mg kg⁻¹ de tecido seco utilizandose alkali, 2-hidroxipropil éter (Sigma-Aldrich) como padrão.

2.4.5.2. Lignina Insolúvel Klason (KL)

A dosagem de lignina utilizando o protocolo de Klason foi realizada segundo Hatfield & Fukushima (2005). O material vegetal foi liofilizado e macerado em N₂ líquido até se obter um pó fino. O material moído foi lavado com 100 mL de acetona em Soxhlet por 8 h, para a remoção de componentes que poderiam formar "pseudoligninas" durante a análise. Em seguida, a acetona foi evaporada em condições ambiente. Foram separados 0,2 g do material seco e adicionados 3 mL de H₂SO₄ (72%), que foram homogeneizados em vórtex e mantidos em banho-maria frio (20°C) por 2 h, sendo agitados por 1 min a cada 10 min. Em seguida, o conteúdo foi transferido para tubos de 125 mL utilizando-se 112 mL de água MilliQ. Esses tubos contendo a amostra em aproximadamente 115 mL de H₂SO₄ a 4% foram selados e autoclavados a 121°C durante 60 min. As amostras foram resfriadas e os hidrolisados foram filtrados a vácuo em filtro de papel, previamente secos em estufa a 105°C e pré-pesados, lavando-se com 200 mL de água MilliQ pré-aquecida a aproximadamente 50°C, para remover resíduos do ácido e açúcares. Os filtros utilizados foram novamente secos *overnight* em estufa a 105°C e pesados. A lignina insolúvel em ácido foi determinada gravimetricamente a partir da diferença do peso final do filtro com seu peso inicial.

2.4.6. Perfil dos oligômeros de lignina

Cerca de 0,1 g de material liofilizado foi finamente macerado e extraídos com etanol 80% em ultra-som, por 30 min, e centrifugados em máxima rotação. O sobrenadante foi recuperado e seco em *speed vac* (Savant). O material seco foi ressuspenso em 0,5 mL de água MilliQ e as ligninas foram extraídas com 0,6 mL de acetado de etila. A fase orgânica foi coletada e evaporada com N₂. O resíduo seco foi solubilizado em solução aquosa, contendo 35 % acetonitrila. Os compostos foram analisados em um cromatógrafo Acquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo (Micromass-Waters) conforme Kiyota et al. (2012). As identificações dos compostos foram baseadas em seus tempos de retenção, m/z e MS/MS com os dados disponíveis em biblioteca de banco de dados das ligninas sintetizados em nosso laboratório. Essas análises foram realizadas pelo Dr. Eduardo Kiyota.

2.4.7. Extração de RNA e Produção de Primeira Fita de cDNA

O material congelado a -80°C foi macerado em almofariz com N₂ líquido, até se obter um pó fino. O RNA total foi extraído pelo método de TRIzol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro a 260 nm, considerando que 1 unidade de DO260 equivale a 40 µg/mL de RNA. Também foi feita a leitura em 280 nm para se estimar a pureza do RNA extraído pela razão A260/A280, que deve estar próxima de 2,0. A qualidade do RNA foi verificada após separação em gel de agarose 1%, com brometo de etídeo, e visualização sob luz UV. As amostras de RNA total foram tratadas usando o kit Turbo DNAse-free (Ambion) e submetidas à transcrição reversa usando o kit SuperScript III de síntese de cDNA primeira fita (Invitrogen).

2.4.8. Análise da Expressão Gênica

Para a PCR em Tempo Real foram desenhados primers específicos com a utilização do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/). A eficiência dos primers foi testada utilizando o software LinReg PCR Analysis of Real-Time PCR data versão 7.5 (Ramakers et al., 2003). As reações da qRT-PCR foram preparadas com o QuantiFastTM SYBR Green PCR Kit (Quiagen). Cada amostra foi processada em triplicata, sendo considerada também uma reação sem cDNA (controle). As PCRs foram analisadas em um iCycler iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. Um valor específico de Ct (Cycle threshold) foi criado, sendo que o Ct é definido como o número de ciclos no qual a taxa de amplificação do gene alvo é a mais exponencial para todas as amostras avaliadas. Para se obter o normalizador interno mais adequado, foram testados 3 genes de referência utilizando o software NormFinder (Andersen et al., 2004): ubiquina (UBQ; senso: 5'-TATCAACAGCAATGGGAGCA-3'; antisenso: 5'-GTCAGAAGGGAGCAGATGGA-3'), 5'- CTCCACATTCATCGGCAACTC -3'; tubulina (Tub;senso: antisenso 5'-TCCTCCTCTTCTTCCTCCTCG -3'), e glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; senso: 5'-TTGGTTTCCACTGACTTCGTT-3'; antisenso 5'-CTGTAGCCCCACTCGTTGT-3'). O gene normalizador considerado mais estável foi o *GAPDH*. A quantidade relativa das moléculas alvos em relação ao calibrador foi calculada a partir do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para as variedades submetidas aos tratamentos (Livak and Schmittgen, 2001). Para a análise por qPCR foram utilizadas triplicatas biológicas para cada tratamento.

2.4.9. Perfil dos Metabólitos Primários

Cerca de 20 mg de amostra liofilizada de cana-de-açúcar foram extraídas em metanol, água e clorofórmio, conforme previamente descrito (Lisec et al., 2006), e foram usadas para a determinação do perfil metabólico por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (Roessner et al., 2001). Essa análise permitiu a identificação e quantificação de aproximadamente 50 diferentes compostos, representando as principais classes de compostos (amino ácidos, ácidos orgânicos, açúcares e outros).

2.4.10. Análises Estatísticas

O teste T de *Student* foi utilizado para avaliar as diferenças entre controle e tratamento, nas concentrações de açúcares solúveis, lignina (KL e TGA) e metabólitos primários. Foram utilizadas triplicatas biológicas em todas essas análises. Para os dados biométricos, trocas gasosas e análises de expressão, todos os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% para comparação de médias utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.5. Resultados

2.5.1. Dados Biométricos

Para identificar possíveis modificações fenotípicas induzidas pelos tratamentos aplicados, foram analisados alguns dados biométricos na coleta das canas-de-açúcar. Em relação ao diâmetro dos entrenós, a variedade IACSP04-065 (com menor teor de lignina) demonstrou possuir, na média, um diâmetro maior quando comparada com a IACSP04-627 (Figura 2A e B). Entretanto, nenhum tratamento causou qualquer alteração significativa no diâmetro dessas plantas, em relação ao controle. De maneira geral, no tratamento N2 o número de folhas, a massa fresca do colmo e o número de entrenós foram significativamente maiores na IACSP04-627, quando comparada com a outra variedade (Figuras 2C, E e F). Por outro lado, no tratamento RL, IACSP04-065 apresentou valores significativamente maiores para a massa fresca das folhas e o número de entrenós, em relação à IACSP04-627 (Figuras 2D e F). Em relação ao comprimento do colmo, IACSP04-627 apresentou valores significativamente maiores para todos os tratamentos, em relação à outra variedade (Figura 2G).

Apesar dessas diferenças entre os materiais, nenhum dos tratamentos levou a alterações significativas na variedade IACSP04-065 em relação ao controle. Para IACSP04-627, o N2 foi o único capaz de causar aumento significativo no número de entrenós, em relação ao controle (Figura 2F).

104



Figura 6. Dados biométricos das variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas a 100% de luminosidade solar e sem tratamento com N (C = *control*), tratadas com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro do mesmo genótipo; letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento (p<0,05). A. Diâmetro dos colmos de IACSP04-065 (I = *internode*); B. Diâmetro dos colmos de IACSP04-627 (I = *internode*); C. Número de folhas verdes; D. Massa fresca das folhas; E. Massa fresca dos colmos; F. Número de entrenós; G. Comprimento dos colmos.

2.5.2. Trocas Gasosas

A variedade IACSP04-065 apresentou maiores valores para todos os parâmetros avaliados quando comparada com IACSP04-627, exceto para a eficiência de carboxilação. De maneira geral, houve um aumento das trocas gasosas de plantas submetidas aos tratamentos com N e uma redução nas plantas submetidas à menor incidência luminosa (Figura 3).



Figura 7. Trocas gasosas dos genótipos de cana-de-açúcar, IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas a 100% de luminosidade solar e sem tratamento com N (C = *control*), tratadas com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). A. Taxa fotossintética; B. Taxa de transpiração; C. Condutância estomática; D. Eficiência do uso da água e E. Eficiência instantânea de carboxilação. Valores médios obtidos a partir de sete repetições a P = 0,005. Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro do mesmo genótipo; letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento.

2.5.3. Açúcares Solúveis

Para a variedade IACSP04-065, a quantidade dos açúcares solúveis totais (AST) no colmo apresentou uma tendência de aumento na região madura com os tratamentos aplicados, mas esse acréscimo não foi significativo em relação ao controle (Figura 4A). Para a variedade IACSP04-267, a concentração de AST permaneceu constante na região jovem e madura, em relação ao controle, para todos os tratamentos (Figura 4C).

Os monossacarídeos (frutose e glicose) foram detectados em níveis muito baixos na região madura, das amostras controle da variedade IACSP04-065, porém os tratamentos aplicados induziram um acréscimo significativo desses açúcares nessa região da cana-de-açúcar. Sacarose permaneceu inalterada nessa variedade (Figura 4B). Para IACSP04-627, as concentrações dos mono- (frutose e glicose) e dissacarídeos (sacarose) não sofreram alteração com a aplicação dos tratamentos, em relação ao controle (Figura 4D).



Figura 8. Teor de açúcares solúveis em colmos imaturos (entrenós 1+2+3; Y = *young*) e maduro (entrenó 12; M = *mature*), das variedades IACSP04-065 (A e B) e IACSP04-627 (C e D), submetidas a 100% de luminosidade solar e sem tratamento com N (C = *control*), tratadas com duas doses de uréia

(N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. * indica diferença significativa entre o controle e os tratamentos ($p \le 0,05$).

2.5.4. Dosagem de lignina – TGA

A figura 5 traz os resultados da dosagem de lignina nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627 obtidos pelo método TGA.

Considerando os tratamentos aplicados, observou-se que para a variedade IACSP04-065, na região periférica imatura (YR), os tratamentos N2 e RL resultaram em acúmulo significativo de lignina, em relação ao controle. Entretanto, na região central imatura do colmo (YP), apenas o tratamento RL induziu aumento na concentração de lignina, em relação ao controle. Na região periférica madura (MR) nenhum dos tratamentos induziu alterações no nível de lignina, enquanto na região madura central (MP), observou-se aumento significativo nas amostras tratadas com N no maior nível (N2).

Para a variedade IACSP04-627, nas regiões jovens, periférica e central (YR e YP), e região madura periférica (MR) a redução da incidência luminosa (RL) aumentou significativamente a concentração de lignina, em relação ao controle, enquanto na região central madura (MP), observou-se diminuição significativa nos níveis de lignina para os tratamentos N1e RL.



Figura 9. Conteúdo de lignina obtido pelo método TGA, nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas a 100% de luminosidade solar e sem tratamento com N (C = *control*), tratadas com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. As letras comparam os diferentes tratamentos dentro do mesmo genótipo e mesma região (p<0,05). YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro.

2.5.5. Dosagem de lignina insolúvel – KL

Para a variedade IACSP04-065, a região imatura periférica (YR) foi a única que sofreu alguma alteração no conteúdo de lignina insolúvel, devido à aplicação dos tratamentos, sendo que os tratamentos N1 e a RL resultaram em diminuição significativa no teor de lignina, em relação ao controle (Figura 6). Para a variedade IACSP04-0627, observou-se aumento no conteúdo de lignina insolúvel apenas na região imatura central (YP), para as plantas tratadas com redução luminosa (RL). Nas outras regiões, o conteúdo de lignina insolúvel permaneceu inalterado (Figura 6).



Figura 10. Conteúdo de lignina insolúvel obtido pelo método KL, nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas a 100% de luminosidade solar e sem tratamento com N (C = *control*), tratadas com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. As letras comparam os diferentes tratamentos dentro do mesmo genótipo e mesma região (p<0,05).YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro.

2.5.6. Perfil dos oligômeros de lignina

Nas amostras solúveis de lignina foram identificados um aldeído (coniferil aldeído), um monolignol (G), três dímeros e três trímeros, sendo que um deles (m/z=613) apresentou esteroisomeria (tempo de retenção=3.52 e 4.34; Tabela 2). Dois dos dímeros e dois dos trímeros apresentam ligações 8–5 com os monômeros G, que resultam em ligações mais recalcitrantes. As outras ligações presentes nos trímeros (8–O–4) são caracterizadas como as de mais fácil clivagem.

m/z	Retention Time (min)	Structure
177	3.3	coniferyl aldehyde
179	2.72	coniferyl alcohol (G)
327	3.21	G(8-5)H
357	3.39	G(8-5)G
417	3.79	S(8–8)S
493	3.74	H(8-5)H(8-O-4)G
583	3.57	G(8-O-4)S(8-5)G
613	3.52, 4.34	S(8-O-4)S(8-5)G

Tabela 2. Massa (m/z) e tempo de retenção dos monolignóis, aldeídos e oligômeros identificados nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, obtidos por UPLC-MS/MS.

Dados das estruturas adquiridos de Kiyota e colaboradores (2012).

Para a região periférica jovem (YR) de IACSP04-065 foram detectados o dímero G(8-5)G(m/z = 357) e o trímero H(8-5)H(8-O-4)G(m/z = 493). Na região jovem central (YP), no tratamento N2, detectou-se o coniferil aldeído e o dímero G(8-5)H(m/z = 327), e no tratamento RL além de se detectar esse mesmo dímero anteriormente citado, também detectou-se o trímero G(8-O-4)S(8-5)G(m/z = 583) (Figura 7A).

Para a região madura periférica (MR), no tratamento N1 não foram detectados coniferil aldeído, G(8–5)H (m/z = 327) e G(8–O–4)S(8–5)G (m/z = 583). Já no tratamento RL foram detectados G(8–5)G (m/z = 357), S(8–8)S (m/z = 417) e S(8–O–4)S(8–5)G (m/z = 613). Por fim, na região madura central (MP), nos tratamentos com N (N1 e N2) foi detectado o aldeído e no RL o trímero S(8–O–4)S(8–5)G (m/z = 613) (Figura 7A). As estruturas identificadas foram mais frequentemente observadas na região periférica imatura (YR), para essa variedade, com uma prevalência de monômeros e dímeros na região imatura e trímeros na madura.

Para IACSP04-627, na região periférica imatura (YR) dos tratamentos com N (N1 e N2) foi detectado o dímero S(8–8)S (m/z = 417), e nos três tratamentos também detectou-se o trímero S(8–O–4)S(8–5)G (m/z = 613). Na região central jovem (YP), a redução de

luminosidade solar impossibilitou a detecção de G(8–5)H (m/z = 327), G(8–O–4)S(8–5)G (m/z = 583) e S(8–O–4)S(8–5)G (m/z = 613). (Figura 7B).

Na região periférica madura (MR) foram observadas alterações apenas para o aldeído no tratamento N1, o qual não pôde ser detectado, e a presença dos dímeros G(8-5)G (m/z =357) e S(8-8)S (m/z = 417) e ausência do trímero S(8-O-4)S(8-5)G (m/z = 613), no tratamento N2. Na região madura central (MP), nos tratamentos N2 e RL não se detectou o monoligol G e os dímeros G(8-5)G (m/z = 357) e G(8-5)H (m/z = 327), sendo que essa última também não foi encontrada no tratamento N1. Os três trímeros identificados também não foram detectados no tratamento N2, sendo que o H(8-5)H(8-O-4)G (m/z = 583) também não foi encontrado no tratamento N1 (Figura 7B). Assim como observado na outra variedade, houve uma tendência de monômeros e dímeros estarem mais frequentemente presentes na região jovem e os trímeros na região madura.



Figura 11. Distribuição dos oligômeros (m/z) identificados nas variedades IACSP04-065 (**A**) e IACSP04-627 (**B**) submetidas a 100% de luminosidade solar e sem tratamento com N (C = *control*), tratadas com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo

jovem, MR (mature rind) = casca madura, MP (mature pith) = miolo maduro.

2.5.7. Análise de expressão

Em função dos resultados obtidos no Capítulo 1, o ortólogo mais expresso de cada gene foi selecionado para análise de expressão, nos genótipos submetidos aos tratamentos N2 e RL. O tratamento N1 foi excluído das análises de expressão, devido às maiores alterações, nos outros ensaios, terem sido observadas para o tratamento N2. O gene codificando para a enzima F5H foi o único que apresentou problemas nas análises de expressão (baixa eficiência) e foi retirado das análises. Este gene também apresentou expressão muito baixa nas análises realizadas no capítulo anterior.

De maneira geral, os tratamentos provocaram alterações na expressão dos genes selecionados. Entretanto, dependendo da região (casca; *rind* ou miolo; *pith*) ou grau de

amadurecimento (jovem; *young* ou maduro; *mature*) do colmo, um gene ou outro mostrou maior ou menor grau de expressão (Figura 8).

Para IACSP04-627, os níveis dos transcritos do gene *Sh*PAL1 reduziram significativamente, em relação ao controle, nas regiões maduras (MR e MP) do tratamento RL (Figura 8A). Para IACSP04-065, tanto o tratamento N2 como RL resultaram em aumento significativo no nível de transcrito do *Sh*PAL1 nas regiões maduras (MR e MP), em relação aos respectivos controle (Figura 8B).

Os níveis dos transcritos do gene *Sh*C4H1 reduziram significativamente em relação ao controle, para a variedade IACSP04-627, nas regiões centrais maduras (MP) dos tratamentos N2 E RL (Figura 8C). Para a outra variedade não foram observadas alterações significativas para esse gene (Figura 8D).

Para IACSP04-627, o tratamento RL resultou em diminuição nos níveis dos transcritos de *Sh*4CL2, nas regiões periféricas, jovem e madura (YR e MR) (Figura 8E), enquanto que para a outra variedade esse gene teve seus níveis significativamente reduzidos apenas na região periférica jovem (YR) tratada com N2 (Figura 8F). Em geral, o gene *Sh*HCT-like apresentou redução nos níveis dos transcritos na variedade IACSP04-627, entretanto, em relação ao controle essa diminuição foi significativa apenas para as amostras maduras periféricas (MR) do tratamento RL (Figura 8G). Para IACSP04-065, a expressão do gene *Sh*HCT-like diminuiu nas amostras periféricas tratadas com N2, mas essa redução foi significativa apenas para a amostra periférica madura (MR) (Figura 8H).

Os tratamentos reduziram os níveis de transcrito do gene *Sh*C3H1 em todas as regiões analisadas na variedade IACSP04-627, sendo que essa diminuição não foi significativa apenas para as regiões centrais jovem e madura (YP e MP), tratadas com N2 (Figura 8I). Para a região jovem de IACSP04-065, o número de transcritos do gene *Sh*C3H1 diminuiu na parte periférica

(YR), sendo uma diminuição significativa para o tratamento RL, e aumentou significativamente para a região central (YP), para ambos os tratamentos (N2 e RL). Já para a região madura, o efeito foi oposto, ou seja, aumento de transcritos na região periférica (MR), sendo significativo apenas para o tratamento RL (Figura 8J).

Para IACSP04-627, os tratamentos resultaram em aumento no nível de transcritos do gene *Sh*CCoAOMT1 na região jovem do colmo da cana-de-açúcar, sendo significativo esse aumento, em relação ao controle, para as amostras da região central jovem (YP) tratadas com N2. Para a região madura foi observado uma queda no acúmulo de transcritos, sendo significativa para as partes periférica e central (MR e MP) do tratamento RL (Figura 8K). Para IACSP04-065, observou-se diminuição significativa na concentração dos transcritos de *Sh*CCoAOMT1 para as regiões periféricas jovens (YR), dos tratamentos N2 e RL, e aumento significativo para a região periférica madura (MR) em RL (Figura 8L).

Para a outra CCoAOMT analisada, o padrão de expressão foi diferente do observado para *Sh*CCoAOMT1. *Sh*CCoAOMT3 teve aumento (não significativo) nos níveis de expressão na região jovem tratada com N2 e diminuição com o tratamento RL, sendo significativa apenas para parte periférica (YR). Na parte madura do colmo, observou-se diminuição na quantidade de transcritos, em relação ao controle, e essa queda apenas não foi significativa apenas para a região periférica (MR) tratada com N2 (Figura 8M). Para IACSP04-065, houve uma queda na expressão desse gene na região jovem, sendo significativamente menor que o controle nas regiões periféricas (YR), para ambos os tratamentos (N2 e RL). Para a região madura foi observado aumento significativo nas amostras de miolo (MP) do tratamento RL (Figura 8N).

Em geral, foi observado uma diminuição nos números de transcritos de *Sh*CCR1 para IACSP04-627, sendo essa queda significativa para as amostras maduras periférica e central

(MR e MP) do tratamento RL (Figura 8O). Para a outra variedade, houve aumento significativo no acúmulo de transcritos na região imatura central (YP) e madura periférica (MR) no tratamento RL (Figura 8P). A variedade IACSP04-627 apresentou aumento significativo no nível de transcritos de *Sh*COMT1, em relação ao controle, nas amostras jovens (YR e YP) tratadas com N2. As amostras maduras do tratamento RL apresentaram uma diminuição no número de transcritos, entretanto essa redução foi significativa somente para amostras da região periférica (MR) (Figura 8Q). IACSP04-065 apresentou uma diminuição no acúmulo de transcritos de *Sh*COMT1 na região periférica imatura (YR), para ambos os tratamentos (N2 e RL). Na região madura, observou-se aumento significativo para as amostras de casca (MR) do tratamento RL (Figura 8R).

Por fim, para a região jovem de IACSP04-627, o nível de transcritos do gene *Sh*CAD2 reduziu significativamente nas amostras periféricas (YR) tratadas com baixa intensidade de luz (RL), enquanto que na região central (YP), observou-se aumento significativo para os dois tratamentos, N2 e RL (Figura 8S). Para a variedade IACSP04-065, os tratamentos com N2 e RL resultaram em aumento no nível de transcritos de *Sh*CAD2 nas amostras imaturas centrais (YP), já na região madura houve um decréscimo significativo na região central (MP) tratada com N2 (Figura 8T).

































Figura 12. Indução ou repressão da expressão dos transcritos referentes aos genes envolvidos na biossíntese de lignina, nas variedades IACSP04-627 (**A**, **C**, **E**, **G**, **I**, **K**, **M**, **O**, **Q** e **S**) e IACSP04-065 (**B**, **D**, **F**, **H**, **J**, **L**, **N**, **P**, **R** e **T**), obtida de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro. N indica tratamento com N na maior concentração (150 g de N), RL (*reduced light*) indica tratamento com 50% de luminosidade solar. As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. * indica diferença significativa entre os tratamentos controle e N ou baixa incidência luminosa (p<0,05).

2.5.8. Perfil dos Metabólitos Primários

2.5.8.1. Aminoácidos

Catorze aminoácidos foram identificados nas amostras submetidas aos tratamentos com N e redução da luz solar, em ambas as variedades (Tabelas 3-5 e S1-S8).

De maneira geral, pode-se observar que para as duas variedades, o tratamento mais efetivo na indução da síntese de aminoácidos foi o N2 (Tabelas 4 e S1-S8). Na parte jovem do colmo de IACSP04-065, 12 dos aminoácidos identificados apresentaram aumento significativo em suas concentrações em relação ao controle, sendo que esse efeito foi observado

principalmente na região periférica (YR) (Tabelas 4 e S1). Já na região madura, praticamente todos os aminoácidos apresentaram um aumento significativo em suas quantidades para o tratamento N2, em relação ao controle (Tabelas 4 e S3 e S4).

A maior frequência de redução no conteúdo de aminoácidos foi observado no tratamento RL e com a variedade IACSP04-065 (Tabelas 5 e S1-S4). Nela, as plantas do tratamento RL apresentaram aumento significativo somente dos aminoácidos Asn (YR, YP e MP), Tyr (YP e MR), Gln (MR) e Val (MR), variando entre as regiões analisadas, sendo que para os restantes foi observada uma tendência de diminuição em seus conteúdos relativos, merecendo destaque Orn, que foi o aminoácido que mais reduziu nesta variedade (Tabelas 5 e S1-4).

Para a variedade IACSP04-627, na região jovem do colmo de plantas do tratamento N2, aproximadamente 8 aminoácidos apresentaram níveis significativamente altos em relação ao controle (Tabelas 4, S5 e S6). Nesta variedade, nas regiões maduras, periférica e central (MR e MP), praticamente todos os aminoácidos apresentaram níveis elevados em relação ao controle (Tabelas S7 e S8), conforme também observado para a variedade IACSP04-065 (Tabelas S3 e S4).

	<u>N1</u>									
	IACSP	04-065	IACSP04-627		IACSP	04-065	IACSP	04-627		
Amino acids	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP		
Alanine	0.9	1.0	0.8	0.1	0.6	0.9*	-1.4*	-0.6		
Allo-threonine	0.1	3.3*	0.3	1.3	0.2	1.3*	0.3	0.2		
Asparagine	2.2*	7.9*	0.9	1.6	2.3*	7.1*	0.0	0.0		
Aspartic acid	-0.2	1.2	-0.1	2.0*	-0.3	1.6*	-0.8	0.0		
Cysteine	0.3	1.3	0.0	0.0	0.3	0.1	0.8	-0.2		
GABA	1.7*	0.4	0.8*	0.2	0.6	0.5	-0.3	0.5		
Glutamic acid	0.4	2.4*	-0.4	0.2	0.0	0.9	-1.0	0.6		
Glutamine	-0.4	3.9*	0.2	-2.4	-0.3	0.6	0.5	-0.4		
Glycine	0.2	2.5*	0.5	0.2	-0.1	0.1	-0.5	-0.4		
Ornithine	1.5*	-1.6*	-0.5	0.4	-1.3	-0.8	-0.1	-0.1		
Phenylalanine	0.4	0.2	0.6	1.0	0.3	-0.9	0.0	-0.3		
Serine	0.5	1.9	-0.3	1.4*	0.5	-0.5	-1.2	-0.4		
Tyrosine	0.2	2.3*	0.0	0.0	1.0	3.8*	0.0	-1.3*		
Valine	1.1*	2.1	2.4*	-0.1	-0.7	0.8	1.9	-0.3		

Tabela 3. Quantidade relativa de aminoácidos presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com a menor dose de uréia (N1; 17 g por planta).

	N2										
	IACSI	P04-065	IACSP04-627		IACSI	P04-065	IACSP04-627				
Amino acids	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP			
Alanine	1.8*	3.1*	1.5*	5.1*	1.4	1.5*	1.3*	6.2*			
Allo-threonine	1.5*	4.6*	1.6*	6.4*	0.5	2.6*	3.7*	5.5*			
Asparagine	5.1*	10.2*	3.7*	4.8*	5.5*	10.0*	5.8*	8.7*			
Aspartic acid	1.2*	2.0*	0.7	3.7*	0.8	2.3*	-0.7*	3.0*			
Cysteine	1.2*	4.2*	2.2*	3.2*	1.4*	2.1*	2.9*	3.7*			
GABA	1.0*	1.0*	0.5	3.0*	0.8	1.1*	0.9	2.2*			
Glutamic acid	0.6	2.7*	0.3	3.4*	-0.2	1.5*	-0.1	3.7*			
Glutamine	-0.2	4.0*	0.6*	3.7*	0.0	0.8	0.0	2.0*			
Glycine	1.8*	3.4*	1.5*	4.6*	0.9*	0.8*	2.0	4.0*			
Ornithine	1.9*	1.2*	1.0*	2.7*	1.3	-1.0*	1.9*	1.4			
Phenylalanine	2.9*	1.4*	1.7*	3.9*	1.1*	0.8	2.1*	3.6*			
Serine	1.4*	3.2*	1.1*	5.6*	0.9	1.2*	1.0	4.3*			
Tyrosine	1.7*	2.7	0.0	0.0	1.5	2.3*	-0.1	1.6*			
Valine	2.0*	3.6	1.8	1.5*	1.4*	2.8*	1.1*	2.8*			

Tabela 4. Quantidade relativa de aminoácidos presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com a maior dose de uréia (N2; 150 g por planta).

	RL										
	IACSP	04-065	IACSP04-627		IACSP	04-065	IACS	P04-627			
Amino acids	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP			
Alanine	0.4	-0.6	1.6*	1.3	0.1	0.7	0.4	0.8			
Allo-threonine	-0.7*	-0.1	1.5*	2.2*	-0.6	0.1	2.8	0.4			
Asparagine	2.3*	2.4	3.2*	-0.3	3.3*	3.3*	4.5*	1.0			
Aspartic acid	-0.3	0.0	0.6	2.1*	0.0	1.1	0.3*	0.9			
Cysteine	-0.4	-0.4	1.0*	-0.5	-0.5	-0.2	1.9*	0.6			
GABA	-0.2	-0.3	1.0	1.0*	0.0	1.1	0.5	0.1			
Glutamic acid	-1.6*	0.5	0.1	1.5*	-0.7	0.4	0.4	1.9*			
Glutamine	-0.7*	4.1*	0.6*	0.4	-0.5	0.4	0.3	0.3			
Glycine	-0.8*	-0.3	1.8*	0.7	-0.4	0.6	1.4	-0.3			
Ornithine	-0.4	-2.6*	0.2	1.0*	-2.2*	0.1	0.3	-1.0			
Phenylalanine	-0.2	-0.9*	1.7*	1.5*	0.4	-0.6	1.9*	1.1*			
Serine	-0.6	-0.6	1.0*	2.4*	-0.4	0.2	0.6	0.0			
Tyrosine	0.0*	3.1*	0.0	0.0	1.6*	2.6	0.0	-0.9*			
Valine	-1.1*	0.5*	2.8*	0.8*	-0.8	0.9	2.9*	0.2			

Tabela 5. Quantidade relativa de aminoácidos presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com redução de 50% da incidência luminosa (RL).

A Asn foi o aminoácido que apresentou alterações mais acentuadas nos três tratamentos e em ambas as variedades, tendo atingido níveis muito elevados em alguns casos (Figura 9A e B).



Figura 13. Quantidade relativa do aminoácido Asn nas variedades IACSP04-065 (**A**) IACSP04-627 (**B**) submetidas aos tratamentos com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). * indica diferença significativa

entre os tratamentos controle (C) e N ou baixa incidência luminosa ($p \le 0.05$). Valores apresentados na base Log₁₀. YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro.

Sendo o aminoácido Phe precursor primário na via do fenilpropanóides ele também é destacado. Na variedade IACSP04-065 este aminoácido apresentou altas concentrações, em relação ao controle, nas amostras tratadas com N2, sendo que esse aumento não foi significativo para a amostra da região central madura (MP), em relação ao controle (Figura 10A). Para IACSP04-627, tanto o tratamento N2 como RL foram capazes de induzir o acúmulo de Phe em todas as regiões analisadas (Figura 10B).



Figura 14. Quantidade relativa do aminoácido Phe nas variedades IACSP04-065 (A) IACSP04-627 (B) submetidas aos tratamentos com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. * indica diferença significativa entre os tratamentos controle (C) e N ou baixa incidência luminosa ($p \le 0,05$). YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro.

2.5.8.2. Ácidos Orgânicos

Foram identificados 14 ácidos orgânicos nos materiais submetidos aos tratamentos com N e RL (Tabelas 6-8 e S9-S16).

Para a região imatura de IACSP04-065, o tratamento N2 foi o único que induziu significativamente alguns ácidos orgânicos, quando feita a comparação com o controle (Tabelas 7, S9 e S10). Na região periférica (YR) os ácidos *cis*-3-cafeoil-quínico e

piroglutâmico foram induzidos, e na região central (YP), o ácido glucurônico (Tabelas 7, S9 e S10).

Na região madura dessa mesma variedade, os três tratamentos foram capazes de induzir o acúmulo de alguns ácidos orgânicos (Tabelas 6-8, S11 e S12). O ácido piroglutâmico apresentou elevados níveis nas regiões periférica e central (MR e MP), para os tratamentos N1 e N2 (Tabelas 6, 7, S11 e S12). Já o ácido quínico apresentou níveis elevados na região periférica madura (MR), para os três tratamentos (Tabelas 6-8 e S11). Além disso, observou-se acúmulo do ácido glucurônico nas regiões periférica e central (MR e MP), tratadas com N2, e do ácido glicérico na região central (MP), no tratamentos N2 e RL (Tabelas 7 e 8). Para IACSP04-065, em geral os ácidos orgânicos permaneceram inalterados ou diminuíram em relação ao controle.

Para IACSP04-627, a concentração da maioria dos ácidos orgânicos também se manteve inalterada ou diminuiu em relação ao controle. De maneira geral, o tratamento RL foi o mais eficiente para induzir o aumento do conteúdo de alguns ácidos (Tabela 8). Para a região periférica imatura (YR), nenhum ácido apresentou acúmulo no tratamento N2 (Tabelas 7 e S13). Já os ácidos *cis*-3-cafeoil-quínico e glucurônico apresentaram valores elevados, em relação controle, para as duas regiões jovens analisadas (YP e YR) dos tratamentos N1 e RL (Tabelas 6, 8, S13 e S14). Nas regiões maduras, o ácido piroglutâmico apresentou os maiores níveis, em relação ao controle (Tabelas S15 e S16).

Tabela 6. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com a menor dose de uréia (N1; 17 g por planta).

NT1

				1	1			
	IACSE	P04-065	IACSE	P04-627	IACSE	P04-065	IACSP	04-627
Acids and hydroxy acids	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	-1.5*	-0.2	-0.4	-0.8	-0.1	0.2	-0.1	0.0
cis-3-caffeoyl-quinic acid	-5.5*	-2.6*	3.7*	3.0	-5.5*	-1.3	4.4*	-1.6
Fumaric acid	-0.6	-0.7*	0.6	1.4	-0.5	0.0	1.4*	1.5*
Glucuronic acid	0.5	-2.0*	4.0*	0.3	-6.2*	4.4	6.9	0.1
Glyceric acid	0.0	0.9	0.0	0.2	-0.1	1.3	-0.2	-0.1
Glycolic acid	-0.3*	-0.3	0.3	0.4	-0.2	0.2	1.7*	1.2*
Malic acid	-0.6	1.1	-0.4	1.8*	-0.6*	0.6	-0.1	-1.8*
Phosphoric acid	-0.7	-0.3	-0.5	-1.1*	-0.3	-3.9*	0.4	-1.0*
Pyruvic acid	0.0	-0.1	0.7	0.4	-0.3	-1.2*	-0.7	0.9
Quinic acid	-0.4	3.7*	0.1	-0.7	-0.4	-0.3	0.1	-0.6*
Succinic acid	0.0	0.4	-0.1	1.0	0.0	0.3	0.2	0.6

Os dados foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados na base Log_2 . * indica diferença significativa obtida pelo teste T (P<0.05) em relação ao controle. YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro. Variando do vermelho ao azul, passando pelo branco, os valores positivos (aumento em relação ao controle) estão indicados em vermelho e os negativos (diminuição em relação ao controle), em azul.

	N2								
	IACSP04-065		IACSP	04-627	IACSP	04-065	IACSP	04-627	
Acids and hydroxy acids	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP	
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	-1.4*	0.0	-0.4	-0.7	-0.1	0.2	0.3	-0.1	
cis-3-caffeoyl-quinic acid	2.2*	-3.0*	0.1	2.1	0.2	0.0	0.0	0.8	
Fumaric acid	-0.1	-0.8*	0.4	0.5	-0.8*	-0.5*	1.0*	1.7	
Glucuronic acid	-0.7	1.4*	-0.3*	-0.2	0.7*	6.7*	4.6	0.1	
Glyceric acid	0.2	0.5	-0.8	-0.4	-0.2	1.1*	0.0	0.3	
Glycolic acid	-0.9*	-0.6	-1.6*	0.0	-0.6*	-0.1	0.4	0.1	
Malic acid	-0.7	0.5	-0.4	0.1	-0.5*	0.6	0.1	0.6*	
Phosphoric acid	-0.8	-1.7*	-1.6*	-3.2*	-1.0*	-5.1*	-0.4	-2.8*	
Pyruvic acid	0.5	0.3	-0.8*	0.0	-0.1	-0.3	-0.3	1.3	
Quinic acid	-0.4	2.9*	0.0	-1.0*	-1.1*	-1.1	-0.3*	-0.5	
Succinic acid	0.1	0.4	-0.5*	0.2	-0.1	-0.1	0.3	0.8	

Tabela 7. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com a maior dose de uréia (N2; 150 g por planta).

Os dados foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados na base Log_2 . * indica diferença significativa obtida pelo teste T (P<0.05) em relação ao controle. YR (*young rind*) = casca jovem, YP (*young pith*) = miolo jovem, MR (*mature rind*) = casca madura, MP (*mature pith*) = miolo maduro. Variando do vermelho ao azul, passando pelo branco, os valores positivos (aumento em relação ao controle) estão indicados em vermelho e os negativos (diminuição em relação ao controle), em azul.

				K	L			
	IACSP04-065		IACSP	04-627	IACSP	04-065	IACSP	04-627
Acids and hydroxy acids	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	-1.3*	-0.1	-0.5	-0.7	-0.1	0.0	0.0	0.3
cis-3-caffeoyl-quinic acid	-4.7*	-3.1*	4.5*	2.2	-6.4*	-2.0*	3.0*	0.0
Fumaric acid	-0.8*	-0.5*	0.5	1.1*	-0.8*	-0.4*	1.2*	1.3*
Glucuronic acid	-4.8*	-2.0*	3.6*	0.4	-6.0*	0.0	6.1*	3.9*
Glyceric acid	-0.1	0.6	0.3	1.0*	-0.3	1.7*	0.1	-0.3
Glycolic acid	-0.1	-0.2	-0.2	0.4	-0.6*	-0.3	0.8*	0.3
Malic acid	-0.4	2.7*	0.0	2.4*	-0.3	0.6	0.5	1.0*
Phosphoric acid	-0.7	0.3	0.9	-0.3*	-0.2*	-0.8*	0.8*	0.7*
Pyruvic acid	0.5	-0.8	0.0	0.0	-1.6*	-0.3	-0.8	1.2*
Quinic acid	-0.4*	4.3*	0.0	0.5	-0.3*	0.6	-0.1	0.4
Succinic acid	-0.3	0.3	-0.1	0.8	-0.8*	-0.1	0.1	0.5*

Tabela 8. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com redução de 50% da incidência luminosa (RL).

2.5.8.3. Polióis (sugar alcohols)

Foram identificados 5 polióis nas amostras analisadas. Na região imatura da variedade IACSP04-065 não se observou aumento significativo na quantidade relativa dos polióis. Observou-se aumento significativo do galactinol nas amostras periféricas (YR) para os três tratamentos (Figura 11A) e para as amostras centrais (YP) dos tratamentos N1 e RL (Figura 11B). Na região madura, os níveis de sorbitol aumentaram, em relação ao controle, sendo significativo apenas para a periferia do colmo (MR) com os dois tratamentos com suplementação de N (Figura 11C). Para a região central (MP) não ocorreram alterações nos polióis devido aos tratamentos (Figura 11D).



Figura 15. Quantidade relativa dos polióis identificados na variedade IACSP04-065 submetida aos tratamentos com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. * indica diferença significativa entre os tratamentos com N ou baixa incidência luminosa em relação ao controle (igual à 1,0) (p \leq 0,05). A. YR (*young rind*) = casca jovem; **B.** YP (*young pith*) = miolo jovem; **C.** MR (*mature rind*) = casca madura; **D.** MP (*mature pith*) = miolo maduro.

Para a região imatura de IACSP04-627, observou-se aumento no galactinol nas plantas tratadas com N1 e RL. Na região periférica (YR) também houve aumento do mio-inositol nas plantas dos três tratamentos, enquanto que para a região central (YP) esse aumento foi observado apenas no tratamento RL (Figura 12 A e B).

Na região madura, o tratamento RL provocou aumento no manitol e mio-inositol, na parte periférica (MR) do colmo (Figura 12C). Para a parte central (MP), os tratamentos N2 e RL provocaram aumento no glicerol, mio-inositol e sorbitol, sendo que esse último também foi induzido pelo tratamento N1 (Figura 12D).



Figura 16. Quantidade relativa dos polióis identificados na variedade IACSP04-627 submetida aos tratamentos com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. * indica diferença significativa entre os tratamentos com N ou baixa incidência luminosa em relação ao controle (igual à 1,0) (p≤0,05). A. YR (*young rind*) = casca jovem; **B.** YP (*young pith*) = miolo jovem; **C.** MR (*mature rind*) = casca madura; **D.** MP (*mature pith*) = miolo maduro.

2.5.8.4. Açúcares

Foram identificados 15 diferentes açúcares no material analisado (Tabelas 9-11 e S17-S24). Na variedade IACSP04-065, observou-se redução da frutose na região periférica jovem (YR; Tabela S17) do colmo nos três tratamentos, enquanto nas outras regiões analisadas, ocorreu aumento significativo desse monossacarídeo, em relação ao controle (Tabelas 9-11 e S18-S20). A galactose também sofreu aumento devido aos tratamentos, em três regiões analisadas: YR, MR e MP (Tabelas S17, S19 e S20).

Para glicose, observou-se acúmulo apenas nas regiões maduras de IACSP04-065, sendo significativo para a região periférica (MR) do colmo da cana-de-açúcar, em relação ao

controle (Tabelas S19). Nessa variedade, a sacarose praticamente permaneceu inalterada, e em geral, observou-se um aumento da α - α -trehalose em todas as amostras analisadas.

As amostras da região periférica imatura (YR) da variedade IACSP04-627 apresentaram aumento apenas para o açúcar 3-deoxyglucosone. De forma geral, os outros açúcares permaneceram inalterados, exceto para o tratamento RL, que resultou em uma diminuição significativa de muitos dos açúcares identificados, com exceção do melezitose, que apresentou aumento significativo, em relação ao controle (Tabela 23).

Para a região central imatura (YP) do colmo, os tratamentos N1 e RL foram mais eficientes na indução dos açúcares, como por exemplo, da frutose, galactose, glicose e melezitose (Tabela 24). A sacarose permaneceu inalterada para as duas regiões imaturas analisadas.

Na região periférica madura (MR) de IACSP04-627, os tratamentos com N (N1 e N2) resultaram em aumento significativo da frutose, galactose e glicose (Tabelas 9 e 10), enquanto para as plantas do tratamento RL foi observada diminuição desses mesmos açúcares (Tabela 11). Na região central madura (MP), o tratamento N1 resultou em aumento da frutose e galactose (Tabela 9). Já para o tratamento N2, apenas a manose apresentou acúmulo significativo (Tabela 10). Por fim, o tratamento RL provocou aumento da fucose, sacarose e α -a-trehalose (Tabela 11). Os outros açúcares que apresentaram alterações significativas foram devidos uma diminuição no acúmulo, em relação ao controle.

Além dos açúcares citados anteriormente, alguns outros também sofreram alteração devido aos tratamentos aplicados.

				1	1			
	IACSP	04-065	IACSP	04-627	IACSP	04-065	IACSP	04-627
Sugar	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP
3-deoxyglucosone	0.7	-0.5	4.2*	-0.4	-1.0*	-0.6	2.4	0.0
Fructose	-0.6*	3.0*	0.1	0.4*	0.3*	5.0*	1.2*	0.2*
Fucose	-0.1	3.1*	0.4	0.1	-0.1	3.5*	0.2	0.3
Galactose	1.3*	2.1*	0.1	0.5*	0.0	2.6*	0.9*	0.3*
Glucose	-0.9	3.2*	0.2	0.2*	-0.6	1.2	1.3*	0.0
Kestose	-1.1*	-0.7	-0.1	0.0	-0.5	-0.3	-0.5	0.7
Maltose	-0.3	1.5*	-0.5	0.4	1.2*	1.6	-0.2	0.7
Mannose	-0.3	3.2*	0.0	0.6	1.2*	0.9	0.6*	1.5
Melezitose	1.9*	-1.5*	-0.3	-1.4	0.7*	2.2*	3.3*	-1.0
Raffinose	2.9*	-0.4	-5.2*	-4.0	3.6*	-3.2	-6.0*	0.0
Sucrose	-1.1	-0.1	0.0	-0.1	-0.5	0.2*	0.3	0.1
Turanose	0.6	0.0	0.0	0.4	0.1	-1.6	1.9	-2.3*
Xylose	2.6*	0.2	-0.1	0.0	0.0	1.3*	-0.3	0.4
Xylulose	-0.1	1.6*	-0.2	0.4	0.2	2.4*	-0.6	0.7
α - α -trehalose	3.5*	1.0	-0.5	0.1	4.8*	0.8	-1.8*	1.4*

Tabela 9. Quantidade relativa dos açúcares presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com a menor dose de uréia (N1; 17 g por planta).

	N2								
	IACSP	04-065	IACSP	04-627	IACSP	04-065	IACSP	04-627	
Sugar	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP	
3-deoxyglucosone	0.8	1.9*	0.6*	0.5	1.4*	-0.6	-0.2	0.2	
Fructose	-0.5*	3.9*	0.1	0.5*	0.3*	5.2*	0.7	-0.1	
Fucose	0.0	3.2*	0.0	0.3	0.2	3.4*	0.0	0.8	
Galactose	0.8*	2.0*	0.1	0.8*	0.1	3.0*	0.3	0.0	
Glucose	-0.9	3.5*	0.2	0.5*	-0.7	1.2	0.8	-0.2	
Kestose	-1.3*	-0.4	0.2	0.2	-0.5	0.1	-0.4	0.1	
Maltose	-0.8	1.7*	0.6	-0.4	2.1*	1.8	-0.2	0.1	
Mannose	-0.3	4.3*	-0.1	5.3	1.2*	1.2	0.6*	1.4*	
Melezitose	1.1*	-2.2*	0.3	-1.3	-0.8*	1.3	-1.6*	-1.0*	
Raffinose	-0.1	-0.4	0.3	-2.1	0.4	-2.4	-0.4*	0.0	
Sucrose	0.0	0.0	-0.2	-0.2	0.0	0.2	0.3	-0.2	
Turanose	2.9	2.2*	0.0	-0.1	1.5*	-1.1	3.2	0.1	
Xylose	0.0	0.2	-0.1	-0.5	0.3	1.7*	-1.3	0.1	
Xylulose	0.0	2.1*	-0.1	0.7*	0.1	2.1*	1.1*	0.1	
α - α -trehalose	0.7	1.1*	-0.3	-0.2	2.6*	0.4*	-0.2	-0.2	

Tabela 10. Quantidade relativa dos açúcares presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com a maior dose de uréia (N2; 150 g por planta).

				K				
	IACSP	04-065	IACSP	04-627	IACSP	04-065	IACSP	04-627
Sugar	YR	MR	YR	MR	YP	MP	YP	MP
3-deoxyglucosone	-3.0*	-0.9	3.7*	-1.4	-1.2*	-0.3	2.4*	-2.5*
Fructose	-0.6*	3.2*	-0.7*	-2.0*	0.3*	4.9*	4.2*	-0.6*
Fucose	0.1	3.1*	0.2	0.1	-0.2	3.4*	0.4	1.4*
Galactose	1.3*	2.1*	-0.7*	-1.5*	0.1	3.5*	4.1*	-0.6*
Glucose	-0.7	3.5*	-0.1	-1.4*	-0.7	0.9	3.0*	-0.3*
Kestose	-0.5	-0.6	-0.8	1.0	-0.6	-0.4	-1.4	1.6*
Maltose	-0.4	0.4	-2.4*	-0.5	1.1*	1.5	2.7*	-1.1
Mannose	-0.5	3.3*	-0.2	0.5	1.2*	0.8	4.0*	-2.0*
Melezitose	0.5*	-1.6*	4.7*	-1.4	0.3	1.7*	2.3*	-1.8*
Raffinose	3.7*	-3.1*	-5.5*	-3.6	3.1*	0.0	-6.8*	0.0
Sucrose	0.0	0.1	-0.6	-0.1	-0.1	-0.1	-0.2	0.4*
Turanose	0.5	-0.1	0.0	-2.0*	-0.6	0.2	3.3	-2.7*
Xylose	0.2	-0.4	-0.6*	0.0	-0.4	1.3*	1.4*	-1.6*
Xylulose	0.0	1.4*	-0.4*	0.3	0.0	2.4*	2.8*	-2.3*
α - α -trehalose	3.5*	1.4*	-2.7*	0.0	4.4*	0.5*	-2.3*	1.3*

Tabela 11. Quantidade relativa dos açúcares presentes nas variedades IACSP04-065 e IACSP04-627, submetidas ao tratamento com redução de 50% da incidência luminosa (RL).

2.5.8.5. Uréia

Além dos metabólitos citados anteriormente, foram identificados nas amostras um composto nitrogenado, a uréia. Na variedade IACSP04-065 as quantidades de uréia diminuíram significativamente em relação ao controle, principalmente nas plantas dos tratamentos N1 e RL (Figura 13A). Para IACSP04-627 não foram observadas alterações significativas nas concentrações desse composto nitrogenado (Figura 13B).


Figura 17. Quantidade relativa de uréia nas variedades IACSP04-065 (A) IACSP04-627 (B) submetidas aos tratamentos com duas doses de uréia (N1 e N2, 17 g e 150 g de N por planta, respectivamente) e 50% da luminosidade solar (RL = *reduced light*). As barras verticais indicam erro padrão das médias de triplicatas independentes. * indica diferença significativa entre os tratamentos com N ou baixa incidência luminosa em relação ao controle (igual à 1,0) (p≤0,05). A. YR (*young rind*) = casca jovem; B. YP (*young pith*) = miolo jovem; C. MR (*mature rind*) = casca madura; D. MP (*mature pith*) = miolo maduro.

2.6. Discussão

A cana-de-açúcar é uma cultura industrial responsável por cerca de 70% do açúcar produzido no mundo e extremamente eficiente na produção de biocombustível (http://www.usda.gov), sendo atualmente uma cultura de grande interesse econômico, devido à necessidade iminente de diminuir a dependência de combustíveis fósseis. Apesar de seu valor e dos grandes esforços no seu melhoramento genético a alta complexidade de seu genoma cria uma série de obstáculos, pois se trata de uma planta poliplóide e frequentemente aneuplóide (ou seja, a presença de um número distinto de cromossomos de diferentes categorias), além de possuir baixa fertilidade e longo ciclo de reprodução (Altpeter and Oraby, 2010).

A lignina é um polímero fenólico presente na parede secundária e principal responsável pela característica recalcitrante da biomassa lignocelulósica, afetando a eficiência dos processos de sacarificação e do pré-tratamento (mecânico, térmico ou químico). Atualmente, busca-se o desenvolvimento de culturas em que a produção do etanol de segunda geração seja facilitada devido a maior facilidade de degradação da lignina, sem que se comprometa seu papel biológico (Vanholme et al., 2012).

No estudo da modulação da deposição da lignina em cana-de-açúcar, foram selecionadas duas variedades contrastantes para o conteúdo desse polímero: IACSP04-065 e IACSP04-627, com baixo e alto conteúdo de lignina, respectivamente, as quais foram submetidas aos tratamentos com duas concentrações de N na forma de uréia e com 50% da incidência de luz solar. Em condições de campo, a fertilização com N é um dos fatores mais relevantes para o crescimento das plantas, sendo que a sua falta é capaz de limitar o crescimento, desenvolvimento e rendimento da cana-de-açúcar; e a luz é essencial devido seu papel na fotossíntese, além de possuir funções sinalizadoras e reguladoras durante o desenvolvimento e processos metabólicos (Eckstein et al., 2012; Portz et al., 2012; Tosens et

al., 2012). Apesar da fertilização com N ou a redução em 50% da intensidade da luz solar, não foram observadas alterações significativas no diâmetro dos colmos, em relação ao controle, para as duas variedades de cana-de-açúcar estudadas. Além disso, esses tratamentos não interferiram relevantemente no desenvolvimento das plantas, considerando as características fenotípicas analisadas (número de folhas verdes, massa fresca das folhas, massa fresca dos colmos, número de entrenós e comprimento dos colmos). Apesar da fertilização com N proporcionar rápidas taxas de crescimento e grande acúmulo de biomassa (Van der Laan et al., 2011), apenas IACSP04-627 apresentou aumento significativo no número de entrenós, em relação ao controle, para o tratamento com a maior concentração de uréia.

Embora a uréia seja rapidamente metabolizada pelas plantas, tem sido frequentemente observado que as plantas fertilizadas somente com este adubo nitrogenado apresentaram crescimento reduzido e sinais de falta de N, comparadas com plantas supridas com outras formas de N (Cao et al., 2010). As razões moleculares para a ineficiência no uso da uréia como a única fonte de N no solo não são plenamente entendidas, mas algumas explicações sobre alterações na homeostase osmótica ou ineficiente distribuição do N na planta tem sido propostas (Witte, 2011). Alfafa (Medicago sativa) mantida em condições bem irrigadas e fertilizada com nitrato de amônio apresentou massa seca, comprimento, diâmetro e número de caules significativamente superior em relação às plantas controle (Fiasconaro et al., 2012). Plantas de arroz (Oryza sativa) que foram fertilizadas com uréia não apresentaram diminuição no conteúdo de N, comparado com plantas que receberam nitrato de amônio, indicando que o fornecimento de uréia foi suficiente para o suprimento de N nessas plantas (Cao et al., 2010). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a uréia fornecida foi suficiente para provocar algumas alterações, não apenas nas medidas biométricas, como também em outras análises realizadas.

A cana-de-açúcar é uma planta C_4 que apresenta alta eficiência fotossintética, assimilando cerca de 10-28 t ha⁻¹ ano⁻¹ do CO₂ atmosférico (Taparia et al., 2012). A fotossíntese está intimamente associada com a captura de luz e o teor de N foliar, dependendo fortemente da disponibilidade desse elemento no solo. Além da influência de outros fatores, a fotossíntese, em cereais e leguminosas, por exemplo, é determinada pela capacidade das raízes capturarem N (Spiertz, 2010). O perfil e gradiente de N na folha correspondem bem com a distribuição da luz na parte aérea das plantas, em termos de quantidade e da qualidade espectral. Uma vez que a fotossíntese aumenta tanto com a quantidade de luz absorvida como com o teor de N, o desenvolvimento do perfil de N nas folhas pode ser considerado como uma resposta plástica, que aperfeiçoa a utilização do N em relação à assimilação de carbono (Dreccer et al., 2000).

Mais de 75% do N reduzido presente em folhas de cereais estão localizados no mesofilo, principalmente na constituição da Rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenasse), e estão envolvidos nos processos fotossintéticos (Bertheloot et al., 2008). Assim, com o aumento dos compostos nitrogenados no solo, ou seja, maior quantidade de nutrientes disponível para a síntese protéica, as plantas de cana-de-acúcar tiveram um aumento significativo na taxa fotossintética e na eficiência de carboxilação. O estado nutricional da planta pode alterar sua capacidade fotossintética, em especial o N, que apresenta função estrutural na planta, e encontra-se intimamente ligado à eficiência de carboxilação da enzima Rubisco (Taiz and Zeiger, 2002). Plantas de arroz crescidas em meio hidropônico, enriquecido com 40 ou 100 mg L⁻¹ de N, também apresentaram aumento na eficiência de carboxilação (Li et al., 2009).

A eficiência de uso da água (A/E) é um parâmetro que depende das taxas de assimilação de CO_2 (taxa fotossintética; A) e da transpiração (E), sendo um importante fator na

determinação da produtividade da cultura e pode ser determinante na aptidão e distribuição das plantas (Ghannoum et al., 2011). De forma geral, a fertilização com uréia resultou em aumento na eficiência de uso da água para ambas as variedades. A condutância estomática (g_s) também influencia a eficiência de uso da água, pois o CO₂ e a água compartilham o mesmo caminho de difusão (Ghannoum et al., 2011; Galmés et al., 2012). Um aumento na eficiência de uso da água pelo aumento na fotossíntese ou diminuição da condutância estomática. Devido ao mecanismo de concentração de CO₂ presente em plantas C₄, o aumento na taxa fotossintética por área da folha é responsável pelo aumento na eficiência de uso da água (Ghannoum et al., 2011), o que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

A transpiração, por sua vez, depende da condutância da camada limítrofe, ou seja, da velocidade do vento, da condutância estomática, e da diferença de pressão do vapor na folha, que é influenciada pela temperatura e umidade do ar ao redor (Ghannoum et al., 2011). Uma vez que se observou aumento da taxa de transpiração, assim como da condutância estomática e da fotossíntese, provavelmente os tratamentos aplicados não devem ter gerado uma situação de estresse hídrico, pela alteração do potencial hídrico do solo.

A queda da taxa fotossintética das plantas do grupo submetido à menor incidência de luz era esperada, uma vez que a redução da fotossíntese está correlacionada com o sombreamento das folhas (Coupe et al., 2006). Entretanto, os aumentos da condutância estomática e da taxa de transpiração a princípio seriam inesperados, pois tratamentos com baixa intensidade de luz ou alta concentração de CO₂ geralmente induzem o fechamento do estômato, reduzindo as taxas de transpiração (Coupe et al., 2006). Entretanto, como nesse estudo as plantas permaneceram em luminosidade normal por 8 meses, a partir do plantio, e posteriormente foram submetidas, durante 3 meses, a 50% de sombreamento, isso pode justificar o aumento no número de estômatos nas folhas jovens, onde as taxas de fotossíntese foram mensuradas, e consequentemente explicar os aumentos nas taxas de condutância estomática e transpiração (Casson and Gray, 2008). Tem sido reportado que o índice de estômatos em folhas em desenvolvimento é sistematicamente influenciado pela luz incidente nas folhas maduras (Thomas et al., 2004). Em tabaco, o sombreamento de folhas jovem em combinação com a exposição das folhas maduras a altas intensidades de luz resultou em um aumento de 24% no número de estômatos, em relação às plantas controle. É importante notar que o aumento da intensidade luminosa e elevados níveis de CO_2 aumentam as taxas fotossintéticas, mas tem efeitos opostos do desenvolvimento de estômatos em folhas novas (Thomas et al., 2004).

Os açúcares possuem um papel central no metabolismo das plantas. Produzidos durante a fotossíntese, eles são substratos para processos energéticos e para a síntese de compostos estruturais e também metabolicamente importantes. Os açúcares estão envolvidos no controle da fotossíntese, crescimento e desenvolvimento, e além de causar mudanças metabólicas, eles agem como moléculas sinalizadoras, como no aborto de órgãos e nas taxas de mitose (Eckstein et al., 2012; Patrick et al., 2012). A sacarose é o principal açúcar produzido na fotossíntese e transportado a longas distâncias pelo floema, e pode ser degradado por duas enzimas: sacarose sintase e invertase. Os produtos da degradação são frutose e respectivamente, UDP-glicose e glicose (Liao and Wang, 2003; Eckstein et al., 2012).

Espécies capazes de acumular altas concentrações de sacarose no parênquima possuem adaptações anatômicas especiais nos tecidos de armazenamento, compartimentalização enzimática nas células de armazenamento e expressão de transportadores para água e açúcares, para administrar a pressão de turgor e permitir a descarga de sacarose contra um gradiente de concentração. A compartimentalização é essencial para o acúmulo de grandes concentrações de açúcar (Patrick et al., 2012). Em cana-de-açúcar, nos tecidos relativamente maduros onde os açúcares são preferencialmente acumulados, o descarregamento de sacarose via apoplasto é o mais relevante. Entretanto, a sacarose não atinge as células do parênquima somente por esse tipo de transporte. A presença de numerosos plasmodesmas sugere que todas as células dentro da bainha vascular estão conectadas simplasticamente (Rae et al., 2005). Medidas da pressão de turgor, extensibilidade da parede e condutividade da membrana no parênquima de canasde-açúcar indicam que a baixa turgescência é mantida pelo particionamento de solutos entre compartimentos simplástico e apoplásticos (Rae et al., 2005).

O acúmulo fenomenal de sacarose em cana-de-açúcar tem sido foco de muitos estudos. Trata-se de uma planta C_4 que acumula altas concentrações de sacarose nos entrenós maduros, chegando a 20% da massa seca, e quantidades menores nos imaturos, onde a frutose e glicose são predominantes (McCormick et al., 2006; Papini-Terzi et al., 2009). Nos colmos das plantas tratadas com diferentes doses de uréia ou expostas a 50% de luz, a concentração dos açúcares solúveis totais não apresentaram qualquer alteração. Houve aumento somente da glicose e frutose, para as regiões maduras dos colmos da variedade IACSP04-065, quando submetida a qualquer dos tratamentos. De forma geral, o aumento dos açúcares nas plantas tratadas com uréia à princípio era esperado, devido ao aumento na taxa fotossintética, entretanto, esse efeito não foi observado. Em alfafa, a fertilização com N mostrou afetar significativamente as concentrações dos açúcares totais nos caules. Entretanto, o acúmulo foi mais acentuado em plantas noduladas, em relação a plantas suplementadas com nitrato de amônio, indicando que a fonte de N resulta em respostas diferentes no acúmulo do açúcar (Fiasconaro et al., 2012). A aplicação de altas quantidades de N pode resultar em queda nas reservas de carboidratos, pois nessa situação o N estimula a síntese de aminoácidos e amido em detrimento ao acúmulo de carboidratos (White, 1973).

Com a redução luminosa, à princípio esperava-se diminuição na concentração dos açúcares, o que não foi observado em nenhuma das variedades. Folhas maduras de *Arabidopsis*, por exemplo, tratadas com baixa luminosidade apresentaram redução significativa dos açúcares nas folhas em desenvolvimento, após 4 horas de tratamento (Coupe et al., 2006). Em canas-de-açúcar, que tiveram 90% de todas suas folhas cobertas, exceto a terceira folha totalmente expandida, que ficou exposta à iluminação, observou-se diminuição nas concentrações de sacarose nos entrenós maduros (10 e 12) e na folha exposta (terceira folha) (McCormick et al., 2006). Assim, possivelmente o período em que as plantas permaneceram a 50% de luz não foi suficiente para alterar os níveis de açúcares anteriormente acumulados nessas plantas.

Os dados de GC-MS corroboram em parte com os resultados obtidos pelo método colorimétrico, levando em consideração que para o primeiro foram analisados casca (R) e miolo (P) separadamente, e para o segundo, apenas o miolo foi analisado. No caso da sacarose, por exemplo, as concentrações também permaneceram praticamente inalteradas para todos os tratamentos em ambas as variedades, exceto por dois aumentos discretos (~0,3 vezes, em relação ao controle) observados na região central madura (MP) para IACSP04-065, com a menor dose de uréia e para IACSP04-627 com a redução da intensidade luminosa. Em geral, observou-se aumento da glicose principalmente na região periférica madura (MR) das duas variedades, devido à aplicação da uréia, já com a redução da luminosidade, como se esperava, foi observado uma diminuição no acúmulo de glicose nas regiões maduras de IACSP04-627. Considerando que a análise de açúcares por GC-MS é mais precisa que a colorimétrica, esses dados nos parecem mais robustos para discussão. A frutose, por sua vez, mostrou níveis significativamente elevados para IACSP04-065, nos três tratamentos, enquanto para a outra variedade, de forma geral, observou-se aumento desse monossacarídeo com a fertilização com

uréia e diminuição com a redução da incidência solar. A partir desses dados, pode-se concluir que as variedades aqui analisadas respondem de forma distinta ao acumular os três açúcares solúveis discutidos, sendo que a variedade IACSP04-627 apresentou uma resposta parecida aos dados da literatura.

O metabolismo do carbono (C) e do N estão intimamente interligados (Stitt, 1999; Stitt and Krapp, 1999). Plantas crescidas com limitação de N, por exemplo, acumulam grandes quantidades de carboidratos não estruturais, tanto em ambientes com alta concentração de CO₂, como em condições normais (Stitt, 1999). Os açúcares permanecem em baixa concentração ou diminuem ainda mais em condições limitadas de N, e em geral, há acúmulo de amido ou outros polímeros de estocagem (Stitt, 1999). Segundo dados da literatura, na maioria dos casos há aumento no conteúdo de lignina com a fertilização com N (Pitre et al., 2007), e a explicação é que havendo indução da fotossíntese, o C fixado além de ser armazenado como sacarose, pode ser particionado entre a respiração e compostos da parede celular, como celulose e lignina (Waclawovsky et al., 2010). Entretanto, em plantas de tabaco, foi observado que a deficiência de N resulta em aumento nos níveis de muitos derivados da via dos fenilpropanóides, incluindo a lignina (Fritz et al., 2006). Para as variedades de cana-deaçúcar analisadas pelo método TGA, observou-se acúmulo significativo de lignina para IACSP04-065 nas regiões periférica jovem (YR) e central madura (MP) com a aplicação de uréia na maior concentração; e para IACSP04-627 ocorreu uma diminuição na concentração de lignina na região central madura (MP), com a menor dose de uréia.

Como a alta incidência luminosa está relacionada com o acúmulo de lignina em *Arabidopsis* (Kimura et al., 2003), soja (Su et al., 2005), *Pinus radiata* (Möller et al., 2006) e *Phaseolus radiata* (Chen et al., 2002), esperava-se diminuir a concentração desse polímero nas canas com a redução da incidência solar. Entretanto, esse efeito foi observado apenas na região madura central (MP) de IACSP04-627. Na região jovem, de ambas as variedades, observou-se uma resposta contrária ao esperado, ou seja, aumento na concentração de lignina. A eficiência no uso da radiação tem sido amplamente estudada em gramíneas C_4 , entretanto a relação entre a taxa fotossintética máxima e o acúmulo de biomassa não tem sido muito explorada (Byrt et al., 2011). Ghannoum *et al.* (2011) indicaram grande variação no acúmulo de biomassa entre espécies C_4 , e mostraram baixa correlação entre acúmulo de biomassa e taxa fotossintética.

Os resultados da dosagem de lignina pelo método de KL não confirmam completamente os dados obtidos pelo método TGA. As diferenças entre os métodos utilizados se deve ao fato da dificuldade em se quantificar a lignina, devido à grande variedade na constituição dos monômeros e de suas ligações com carboidratos, proteínas, compostos fenólicos e outros componentes. Esses compostos podem interferir na determinação da lignina, super- ou subestimando as quantidades (Brinkmann et al., 2002). Os métodos adotados nas dosagens seguem dois princípios comumente empregados: métodos gravimétricos, que se baseiam no isolamento da lignina ou resíduos da parede celular (KL); e métodos espectrométricos, que são baseados na decomposição da lignina em produtos solúveis e cuja absorbância é determinada na luz UV (TGA) (Brinkmann et al., 2002). No método TGA, o ácido tioglicólico ataca especificamente as pontes éter na lignina. O aduto tioglicólico é removido dos compostos solúveis, antes das medidas de absorbância (UV). Assim, o método TGA titula principalmente ligações 8-O-4, sendo portanto, específico para as ligninas. A formação de derivados tiolignoglicolatos é um critério para que a lignina seja considerada pura. No entanto, por causa desta especificidade para certas propriedades de ligninas, este método também subestima, em geral, a concentração de lignina (Brinkmann et al., 2002). Já o KL é o método mais antigo e padrão para a análise de lignina em madeira e seu uso para forrageiras tem sido questionado devido à contaminação com proteínas (Jung et al., 1999). Essa metodologia proporciona quantificações corretas apenas para *softwood*, mas para *hardwood*, que contém uma quantidade variável de ligninas ácido solúveis, a estimação do conteúdo de lignina deve ser feito espectrometricamente (Brunow, 2001). A comparação entre os métodos KL e lignina em detergente ácido (LDA), outro método gravimétrico, indicou que o primeiro é mais preciso para analisar o conteúdo de lignina em forrageiras (Jung et al., 1999; Brinkmann et al., 2002). Esses métodos gravimétricos têm sido definidos como material orgânico que não pode ser digerido pelo ácido sulfúrico 72% (Brinkmann et al., 2002).

Em relação à fração solúvel obtida pelo método KL, a determinação da lignina solúvel é feita através do seguinte cálculo: lignina (g/L) = absorbância / caminho da luz (1 cm) x coeficiente de extinção (g^{-1} cm⁻¹) (Lin and Dence, 1992). Entretanto, a determinação do coeficiente de extinção é um problema, particularmente quando está sendo analisada a parede celular de espécies que contém concentrações variadas de unidades G, S e H. Os monômeros G e S, por exemplo, apresentam máxima absorção em 280 e 270 nm, respectivamente. Dessa forma, é possível se obter apenas uma concentração relativa de lignina (Hatfield and Fukushima, 2005).

Sendo assim, foram adotados os métodos TGA e o KL apenas para a fração insolúvel, pois como o coeficiente utilizado na determinação da fração solúvel varia para cada tido de lignina, seria necessário identificar o valor apropriado para esse estudo, uma vez que não é prático utilizar o valor tipicamente citado na literatura (110 g^{-1} cm⁻¹). Além disso, a absorbância utilizada geralmente nas medidas (205 nm) é inapropriada, pois monômeros de açúcares também absorvem na faixa, sendo um grave problema para amostras ricas em açúcares e com baixos conteúdos de lignina, os quais podem ser superestimados (Hatfield and Fukushima, 2005). O TGA pode refletir melhor as reais concentrações de lignina nas amostras, entretanto, mais pesquisas precisam ser realizadas, para assegurar que toda a lignina seja precipitada no passo da adição do ácido, durante a extração (Hatfield and Fukushima, 2005).

Apesar da variação dos conteúdos dos monômeros G, S e H na constituição da lignina entres espécies, tipos celulares e tecidos de uma mesma planta, uma série de evidências sugerem que os mecanismos envolvidos na lignificação são conservados (Raes et al., 2003; Harrington et al., 2012). Além de modificações nas ligações entre os monômeros, diferentes fenilpropanóides também podem ser inseridos na estrutura da lignina, o que tem proporcionado maior eficiência da extração (Vanholme et al., 2012). As ligações 8–O–4 são as mais comuns e caracterizadas como as de mais fácil clivagem. Ligninas ricas em unidades G possuem mais ligações recalcitrantes, como 8-5, 5-5 e 5-O-4, enquanto as ricas em S são menos interligadas e menos recalcitrantes à hidrólise (Kishimoto et al., 2009; Kiyota et al., 2012). De modo geral, o monômero G (m/z = 179) foi mais frequente nas regiões jovens (YR e YP) das duas variedades, o que poderia ser explicado pela dinâmica do processo de polimerização dessas estruturas, que rapidamente são incorporadas em pequenos oligômeros e imobilizadas na parede celular. Além disso, nas regiões imaturas, os dímeros que apresentam ligações 8-5 com os monômeros G também foram mais frequentes. O dímero S(8-8)S foi identificado somente nas regiões das periféricas, imatura e madura (YR e MR), nas duas variedades. Aparentemente, unidades S tendem a ser mais raras que G, sendo que sua presença foi induzida pela aplicação dos tratamentos. Segundo dados da literatura, unidades S são principalmente encontradas em paredes secundárias (Harrington et al., 2012). A presença de trímeros tende a ser mais abundante nas regiões maduras, e a presença na variedade IACSP04-627, parece ter sido fortemente induzida pelos tratamentos. Os resultados indicam que possivelmente os tratamentos proporcionaram aumento na polimerização da lignina.

A biossíntese de parede celular pode reduzir o acúmulo de sacarose, uma vez que o fluxo do C pode ser direcionado para o crescimento celular e expansão da parede celular. Também é possível que o acúmulo de sacarose induza a lignificação (Papini-Terzi et al., 2009). Os tratamentos aplicados não induziram aumento da sacarose nas amostras, e apesar da lignina insolúvel (KL) permanecer praticamente inalterada, principalmente nos entrenós maduros, não se observou um padrão claro para as ligninas ácido solúveis (TGA) e os oligômeros (UPLC-MS/MS), que possibilitasse o entendimento do fluxo de C nas variedades estudas, sob os efeitos dos tratamentos aplicados.

O silenciamento de genes da biossíntese de lignina tem se mostrado vantajoso na liberação de açúcares da biomassa lignocelulósica para fermentação (Chen and Dixon, 2007; Papini-Terzi et al., 2009). Linhagens de alfafa expressando construções antisenso para algumas enzimas envolvidas na biossíntese de lignina, mostrou que a baixa expressão dos genes COMT ou CCoAOMT não afetava a produtividade das plantas, enquanto a menor expressão de C3H ou HCT reduzia consideravelmente a produção de biomassa (cerca de 40%). Um aumento de 166% na produção de açúcar explicava a redução de 40% na produção de biomassa total. A hidrólise enzimática aumentada das linhagens de HCT refletiria, portanto, uma melhoria significativa da produção teórica de glicose fermentável por planta, apesar da redução na produção de biomassa (Chen and Dixon, 2007).

Os tratamentos aplicados resultaram em uma tendência de diminuição ou queda significativa, em relação ao controle, no nível de expressão de todos os genes analisados, nas regiões maduras (MR e MP) da variedade IACSP04-627. Entretanto, houve queda significativa no conteúdo de lignina somente no miolo dos entrenós maduros (MP), tratados com baixa luminosidade, o que corrobora com os dados de análise de expressão. Para região jovem dessa variedade, não observou-se uma padrão de expressão claro. Já para a variedade

IACSP04-065, o nível de transcritos das enzimas analisadas apresentou uma tendência de diminuição ou uma queda significativa, em relação ao controle, na região jovem periférica (YR), em ambos os tratamentos; mas já o acúmulo de lignina foi significativamente maior, em plantas sob esses dois tratamentos, em relação ao controle. Para as outras regiões também não foi observado um padrão claro de expressão. Os padrões de expressão obtidos no presente capítulo e no primeiro demonstram como o processo de deposição e a quantidade acumulada de lignina, em cana-de-açúcar, estão envolvidos em um sistema complexo e dinâmico. Isso se deve ao fato que as variedades modernas de cana-de-açúcar são altamente poliplóides e aneuplóides, com número somático de cromossomos que pode variar de 100 a 130 (2n=100 e 2n=130) e genoma monoplóide com tamanho de cerca de 930 Mbp, o que é comparável com o tamanho do haplótipo do sorgo (Figura 14). Um conjunto completo de alelos homólogos no genoma poliplóide da cana-de-açúcar pode ter cerca de 8 a 10 cópias, caracterizando um genoma altamente redundante (Grivet and Arruda, 2002; Taparia et al., 2012). Essas informações podem explicar a difícil compreensão do padrão de expressão obtido no material analisado.



Figura 18. Comparação dos genomas da cana-de-açúcar e do sorgo. Cada coluna representa um cromossomo alinhado com seus homólogos. 1- genoma de uma célula somática; 2- complemento não replicado de um gameta; 3- complemento cromossômico mínimo não redundante ou conjunto monoplóide (modificado de Grivet and Arruda, 2002).

No presente estudo, foi realizada uma análise do perfil dos metabólitos primários nas duas variedades de cana-de-açúcar, para entender melhor a distribuição desses metabólitos e identificar a relação de alguns deles com o acúmulo ou diminuição do conteúdo de lignina e os tratamentos aplicados. As análises mostraram um padrão de distribuição bastante complexo.

Em diferentes períodos do ciclo de vida, as plantas precisam lidar com a mobilização de reservas de nutrientes, para prover quantidades adequadas de C e N, para órgãos em desenvolvimento. Moléculas contendo N são essenciais para o crescimento das plântulas e o C, entre muitas funções, é desviado em grande quantidade para biossíntese de produtos derivados da via dos fenilpropanóides. O aminoácido Phe, e em menor proporção a Tyr, são os únicos doadores de esqueleto de C para essa via. A enzima PAL catalisa a deaminação da Phe ou Tyr à ácido *trans* -cinâmico ou ácido *p*-cumárico, respectivamente. Esse passo é crucial, pois conecta o metabolismo primário de N com a via do chiquimato, com a alocação de C para a biossíntese dos fenilpropanóides (Cantón et al., 2005).

A maior dose de uréia resultou em acúmulo significativo do aminoácido Phe, para as duas variedades, e diferentemente do esperado, observou-se aumento no nível da expressão do gene PAL apenas para as regiões maduras (MR e MP) de IACSP04-065, o que corresponde apenas com o aumento no conteúdo de lignina observado na região madura central (MP). Para IACSP04-627 ocorreu uma queda (não significativa) no número de transcritos codificando para *Sh*PAL1, na regiões maduras (MR e MP), apesar do acúmulo de Phe. Em relação ao tratamento RL, também ocorreu acúmulo de Phe, mas apenas para a variedade IACSP04-627, e curiosamente houve queda no nível de transcritos de *Sh*PAL1 para esse tratamento, sugerindo que o aumento na concentração da Phe não reflete diretamente na indução da

expressão do gene PAL na variedade citada. A biossíntese de lignina, por sua vez, apresentou um aumento significativo para a região madura periférica (MR) e diminuição para a região madura central (MP) de IACSP04-627, evidenciando a complexidade das respostas obtidas nos experimentos. Em suspensões celulares de *Pinus taeda* foi demonstrado que a disponibilidade de Phe regula diretamente a alocação de C para a biossíntese de lignina (Anterola et al., 2002), mas para as variedades estudadas, essa alocação não parece direta.

Os aminoácidos Asp, Glu e ocasionalmente a Gln são doadores de N para a biossíntese de compostos nitrogenados, como bases dos ácidos nucléicos, poliaminas, clorofilas, além de outros aminoácidos (Cantón et al., 2005), como os aromáticos, os alifáticos com cadeias ramificadas ou não ramificadas, a Lys, a His, a Arg, a Cys, a Met e a Pro (Stitt and Krapp, 1999; Azevedo and Lea, 2001). Os três aminoácidos, Asp, Glu e Gln, foram identificados nas amostras de cana-de-açúcar. Em geral, os tratamentos resultaram em acúmulo desses aminoácidos nas regiões maduras do colmo; mas esse acúmulo foi mais proeminente no tratamento com a maior dose de uréia. Em algas *Selenastrum minutum*, observou-se que a adição de nitrato ou amônio resulta em uma rápida mudança na concentração da Gln, Glu e Asp, além de estimular o fluxo de C para a síntese de ácidos orgânicos (Stitt and Krapp, 1999).

Em plantas, grande parte do N assimilado é canalizada para o aminoácido Asn. Apesar da Gln e Arg serem importantes formas de transporte de N pela seiva do floema, a Asn é a forma predominante em muitas espécies de plantas, como o milho, ervilha, aspargo e *Arabidopsis* (Lam et al., 1998; Cantón et al., 2005). A Asn foi o aminoácido que apresentou os maiores acúmulos nos materiais analisados, inclusive no tratamento com baixa luminosidade, e isso se deve ao fato que a síntese da Asn é fortemente regulada pela luz. Muitos estudos revelam que o nível de Asn livre é muito alto em ervilhas crescidas no escuro, e que o nível desse aminoácido é drasticamente reprimido pelo tratamento com luz. Estudos bioquímicos revelaram que a luz afeta negativamente a atividade da asparagina sintetase (Lam et al., 1998). Plantas de arroz também apresentaram acúmulo de Asn, nos caules e raízes, quando supridas com uréia (Cao et al., 2010).

A assimilação de nitrato requer a síntese de ácidos orgânicos, especialmente o α oxoglutarato e o malato (Stitt, 1999), e a síntese dos ácidos orgânicos é regulada em diversos níveis, a partir de sinais do nitrato, amônio e o metabolismo dos mesmos (Stitt and Krapp, 1999). Nas amostras de cana-de-açúcar não foram identificados o α -oxoglutarato e o malato, porém outros 14 ácidos orgânicos foram identificados. Como dito anteriormente, a fertilização com nitrato leva a mudanças no metabolismo do C, incluindo aumentos nos níveis dos ácidos orgânicos (Stitt, 1999). Entre os ácidos orgânicos que apresentaram maiores alterações estão os ácidos *cis*-3-caffeoyl-quinico, glucuronico, fosfórico, piroglutâmico e quinico.

Os açúcares são o centro do metabolismo primário (Figura 15). Todo o C fixado na fotossíntese passa por açúcar ou seus derivados. Apesar da sacarose ser a principal forma de transporte de C a longas distâncias para a maioria das plantas, algumas espécies transportam outros açúcares derivados da sacarose, como oligossacarídeos da família da rafinose e polióis (Patrick et al., 2012). Em todos os casos descritos, o açúcar acumulado em altas concentrações é a sacarose ou seus produtos hidrolisados: glicose e frutose. O sorbitol, por exemplo, importado para maçãs em processo de desenvolvimento, é rapidamente metabolizado em frutose. A rafinose importada para melões é hidrolisada à sacarose e galactinol, o qual é fosforilado, permitindo sua entrada na síntese da sacarose (Patrick et al., 2012). Como discutido anteriormente, não observou-se mudanças significativas no acúmulo de sacarose nas plantas submetidas aos tratamentos.



Figura 19. Papel central do metabolismo dos açúcares. Processos principais representados nos quadrados em azul e metabólitos chaves em preto. Linhas sólidas indicam fluxo do carbono e energia; linhas pontilhadas representam os mecanismos controles (adaptado de Patrick et al., 2012)

O único dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose é a trealose, sendo o principal açúcar presente em muitas bactérias, algas, fungos e insetos. A ausência de reatividade química associada aos açúcares não redutores é uma vantagem para o armazenamento ou outras funções celulares. Algumas plantas de ressureição (*resurrection plants*) acumulam cerca de 10% de seu peso seco na forma da trealose. Há evidências que a trealose, bem como a frutose e a rafinose aumentam a tolerância contra estresses abióticos, agindo como osmoprotetores. Alta concentração desse dissacarídeo nos colmos de cana-de-açúcar pode ser comercialmente atrativa para a extração direta dessas plantas (Papini-Terzi et al., 2009; Patrick et al., 2012).

Canas-de-açúcar transgênicas, superexpressando um gene bacteriano codificando para trealose, não mostraram qualquer mudança morfológica evidente ou alterações no crescimento e apresentaram maior tolerância à seca no campo (Zhang et al., 2006). As variedades analisadas apresentaram significantes alterações nos níveis da trealose nos colmos. De forma geral, para IACSP04-065, foi evidente o aumento em todas as regiões do colmo analisadas, enquanto que para IACSP04-627 ocorreu diminuição desse açúcar na região imatura do entrenó e acúmulo na região madura, exceto para o tratamento com a maior dose de uréia, em que nenhuma alteração foi observada. Segundo Scheible (2004), o metabolismo da trealose é um dos mais fortemente afetados pela adição de nitrato, e ao que tudo indica a uréia também foi capaz de provocar evidentes alterações no metabolismo desse açúcar.

A rafinose pode ser produzida em muitas plantas, mais notavelmente em sementes de leguminosas, e pode estar envolvida na resistência de plantas contra estresses, incluindo a dessecação (Patrick et al., 2012). Esse açúcar foi o mais fortemente afetado pelos tratamentos, exceto com a aplicação da maior dose de uréia, que foi observado apenas uma ligeira diminuição da rafinose (0,4 vezes) na região jovem central (YP) do entrenó de IACSP04-627. Para os outros tratamentos, IACSP04-065 respondeu com um aumento significativo desse açúcar nas regiões imaturas (YR e YP); e IACSP04-627 teve uma resposta totalmente oposta, ou seja, uma diminuição significativa para as mesmas regiões. Como observado na Figura 16, a produção da rafinose está diretamente ligada à disponibilidade do galactinol. Para as regiões imaturas (YR e YP) de IACSP04-065 tratadas com a menor dose de uréia e baixa luminosidade, o acúmulo da rafinose coincide com a diminuição de galactinol observada nessas mesmas regiões, que provavelmente foi utilizado para a síntese desse açúcar. Enquanto para IACSP04-627, a diminuição significativa da rafinose nas regiões imaturas (YR e YP), tratadas com com a menor dose de uréia e baixa luminosidade, deve estar diretamente relacionada com o relevantes acúmulo do galactinol dessas regiões, indicando que essa variedade acumula uma maior quantidade de galactinol nas regiões jovens, enquanto IACSP04-065 acumula a rafinose.



Figura 20. Via de biossíntese do galactinol e raffinose em plantas (Nishizawa et al., 2008).

Curiosamente, adição de uréia na maior concentração foi o responsável pelas mais evidentes mudanças no nível dos aminoácidos. Entretanto, poucas mudanças foram observadas nos níveis dos carboidratos para esse mesmo tratamento (Tabela 10). Segundo Stitt *et al.* (2002), os níveis de nitrato podem reprogramar o metabolismo de carboidratos, sendo demonstrado que durante a assimilação de nitrato a síntese de carboidratos diminui e mais C é direcionado à síntese de ácidos orgânicos.

Os polióis como o galactinol, sorbitol, manitol, são metabólitos com papel no acúmulo de carboidratos, transporte e resistência a estresses em algumas espécies de plantas. Entretanto, o sorbitol, por exemplo, quando acumulado em níveis substanciais no citosol, torna-se tóxico, causando necrose nos tecidos, nanismo e defeitos no desenvolvimento, mesmo em espécies como a cana-de-açucar, que está adaptada a altos níveis citosólicos de carboidratos (Chong et al., 2007; Patrick et al., 2012). A síntese baixa à moderada de manitol e sorbitol em tabaco tem impactos moderados no desenvolvimento e crescimento, mas altas taxas de sorbitol resultam em desbalanço metabólico e perturbações fisiológicas (Chong et al., 2007). De maneira geral, para as regiões imaturas do entrenó de IACSP04-065, os níveis de galactinol reduziram devido aos tratamentos, e na região periférica madura (MR) os níveis de

sorbitol aumentaram significantemente para os tratamentos com N. Para a outra variedade a resposta foi mais complexa e variou muito, considerando as regiões do entrenó analisadas e os tratamentos aplicados.

Além dos metabólitos discutidos acima, a concentração de uréia também foi determinada nas amostras de cana-de-açúcar a uréia. A uréia é um metabólito derivado da absorção das raízes ou é gerada juntamente com a Orn, a partir do catabolismo da Arg. O metabolismo da Orn na mitocôndria a converte em Glu. A uréia é exportada para o citosol via aquaporinas e é então hidrolisada pela urease, e o amônio produzido é reassimilado no citosol através da biossíntese de Gln, pela glutamina sintetase (GS), e em seguida a glutamato sintase (GOGAT) catalisa a formação de Glu (Witte, 2011). Alterações no conteúdo da uréia foram observadas somente no colmo da variedade IACSP04-065. Em geral, a ação dos tratamentos resultou em diminuição em seus conteúdos no colmo da cana, sendo que provavelmente a uréia foi metabolizada para a formação dos aminoácidos Glu e Gln, os quais apresentaram elevados níveis (Tabelas 3-5).

Embora haja muito conhecimento sobre a biologia e cultivo da cana-de-açúcar, estamos apenas no começo de um entendimento genético e bioquímico detalhado (Waclawovsky et al., 2010). A alta taxa de poliploidia, baixa fertilidade, grande genoma e complexa interação com o ambiente faz com que o melhoramento e o entendimento dessa cultura sejam um trabalho árduo (Zhang et al., 2006). A elucidação da biossíntese de lignina, estrutura e regulação são essenciais para o desenvolvimento de estratégias para o melhoramento da forragem, fibras e bioenergia (Bonawitz and Chapple, 2010), em especial para uma cultura com muito valor agregado e de alta complexidade, como a cana-de-açúcar.

A lignificação é um processo coordenado com a produção da celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos, durante a formação da parede secundária. A regulação é

154

supervisionada por uma complexa rede de fatores de transcrição, tecido- específicos, que respondem a sinais ambientais não completamente definidos, desencadeando uma cascata de expressão de diferentes fatores de transcrição, enzimas e outras proteínas responsáveis pela síntese da parece celular (Bonawitz and Chapple, 2010). A adição de uréia e a baixa luminosidade mostraram-se fatores ambientais que provocam alterações no conteúdo e composição da lignina em cana-de-açúcar. Entretanto as respostas obtidas não foram de fácil interpretação, como pudemos observar. Esses tratamentos também afetaram a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina, bem como de alguns metabólitos primários, envolvidos diretamente ou não na formação da lignina.

As plantas C_4 estão entre os mais eficientes conversores de energia solar em biomassa e representam uma grande oportunidade para a exploração da diversidade genética em termos de crescimento e eficiência no uso de nutrientes. Os fisiologistas vegetais ainda não atingiram a rica fonte genética disponível para o melhoramento das plantas C_4 e somente recentemente os melhoristas começaram focar suas atividades no melhoramento de culturas apropriadas para a produção de biocombustível, como o *miscanthus* e o *switchgrass*, e adaptar o sorgo e a canade-açúcar para o uso não alimentar. Considerando que culturas como o milho têm sido sujeitadas a milhões de anos de seleção, o melhoramento das plantas C_4 para a produção de bioenergia está apenas em sua infância. Como a lignina representa o segundo composto orgânico mais abundante na biosfera, depois da celulose, é imprescindível que grande atenção seja dispendida sobre esse polímero. Dessa forma, estudos de caracterização da lignina em importantes culturas, como aqui apresentado, são de extrema importância para o embasamento de futuros estudos.

2.7. Conclusões

 O conteúdo de lignina aumenta ao longo do colmo em amadurecimento; a adição de uréia e a baixa luminosidade provocaram alterações em seu conteúdo e composição, em relação ao controle;

 Os tratamentos afetaram a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina, favorecendo o acúmulo de unidades G ou S;

A concentração de alguns metabólitos primários também foi alterada com a aplicação dos tratamentos;

• A complexidade do genoma dificulta a identificação de uma correlação direta entre acúmulo de lignina e a expressão dos genes.

2.8. Referências

- Altpeter F, Oraby H (2010) Sugarcane Genetic Modification of Plants. *In* F Kempken, C Jung, eds, Vol 64. Springer Berlin Heidelberg, pp 453-472
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ (2010) Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review. Bioresour Technol 101: 4851-4861
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64: 5245-5250
- Anterola AM, Jeon J-H, Davin LB, Lewis NG (2002) Transcriptional Control of Monolignol Biosynthesis in *Pinus taeda*. J Biol Chem 277: 18272-18280
- Arruda P (2012) Genetically Modified Sugarcane for Bioenergy Generation. Curr Opin Biotechnol 23: 315-322
- Azevedo RA, Lea PJ (2001) Lysine Metabolism in Higher Plants. Amino Acids 20: 261-279
- Barber MS, Ride JP (1988) A Quantitative Assay for Induced Lignification in Wounded Wheat Leaves and its Use to Survey Potential Elicitors of the Response. Physiol Mol Plant Pathol 32: 185-197
- **Bertheloot J, Martre P, Andrieu B** (2008) Dynamics of Light and Nitrogen Distribution during Grain Filling within Wheat Canopy. Plant Physiol **148**: 1707-1720
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2007) Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. Plant Cell Online 19: 148-162
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. Annu Rev Plant Biol 54: 519-546
- **Bonawitz ND, Chapple C** (2010) The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. Ann Rev Genet **44**: 337-363
- Brinkmann K, Blaschke L, Polle A (2002) Comparison of Different Methods for Lignin Determination as a Basis for Calibration of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy and Implications of Lignoproteins. J Chem Ecol 28: 2483-2501
- **Brunow G** (2001) Methods to Reveal the Structure of Lignin. Hofrichter M & Steinbüchel A; Lignin, Humic Substances and Coal; Wiley-VHC, Weinheim 1: 89-116
- **Byrt CS, Grof CPL, Furbank RT** (2011) C4 Plants as Biofuel Feedstocks: Optimising Biomass Production and Feedstock Quality from a Lignocellulosic Perspective. J Integr Plant Biol **53**: 120-135
- Cantón FR, Suárez MF, Cánovas FM (2005) Molecular Aspects of Nitrogen Mobilization and Recycling in Trees. Photosynth Res 83: 265-278
- Cao F-Q, Werner AK, Dahncke K, Romeis T, Liu L-H, Witte C-P (2010) Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. Plant Physiol 154: 98-108
- Casson S, Gray JE (2008) Influence of Environmental Factors on Stomatal Development. New Phytol 178: 9-23
- Cesarino I, Araújo P, Mayer JLS, Paes Leme AF, Mazzafera P (2012) Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. Plant Physiol Biochem
- **Chandel AK, da Silva SS, Carvalho W, Singh OV** (2012) Sugarcane Bagasse and Leaves: Foreseeable Biomass of Biofuel and Bio-Products. J Chem Technol Biotechnol **87:** 11-20
- Chen EL, Chen YA, Chen LM, Liu ZH (2002) Effect of Copper on Peroxidase Activity and Lignin Content in *Raphanus sativus*. Plant Physiol Biochem **40**: 439-444
- **Chen F, Dixon RA** (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. Nat Biotechnol **25**: 759-761
- Chen Y-A, Shin J-W, Liu Z-H (2002) Effect of Light on Peroxidase and Lignin Synthesis in Mungbean Hypocotyls. Plant Physiol and Biochem 40: 33-39

- **Chong BF, Bonnett GD, Glassop D, O'Shea MG, Brumbley SM** (2007) Growth and Metabolism in Sugarcane are Altered by the Creation of a New Hexose-Phosphate Sink. Plant Biotechnol J **5**: 240-253
- Cooke JEK, Brown KA, Wu R, Davis JM (2003) Gene Expression Associated with N-induced Shifts in Resource Allocation in Poplar. Plant Cell Environ 26: 757-770
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 850-861
- Coupe SA, Palmer BG, Lake JA, Overy SA, Oxborough K, Woodward FI, Gray JE, Quick WP (2006) Systemic Signalling of Environmental Cues in *Arabidopsis* Leaves. J Exp Bot **57**: 329-341
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry J-F, Masclaux-Daubresse C (2006) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 47: 74-83
- **Dreccer MF, van Oijen M, Schapendonk AHCM, Pot CS, Rabbinge R** (2000) Dynamics of Vertical Leaf Nitrogen Distribution in a Vegetative Wheat Canopy. Impact on Canopy Photosynthesis. Ann Bot **86:** 821-831
- **Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T** (2005) Hemicellulose. *In* T Heinze, ed, Polysaccharides I, Vol 186. Springer Berlin Heidelberg, pp 1-67
- Eckstein A, Zięba P, Gabryś H (2012) Sugar and Light Effects on the Condition of the Photosynthetic Apparatus of *Arabidopsis thaliana* Cultured *in vitro*. J Plant Growth Regul **31**: 90-101
- Fiasconaro ML, Gogorcena Y, Muñoz F, Andueza D, Sánchez-Díaz M, Antolín MC (2012) Effects of Nitrogen Source and Water Availability on Stem Carbohydrates and Cellulosic Bioethanol Traits of Alfalfa Plants. Plant Sci **191–192:** 16-23
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M (2006) Regulation of Secondary Metabolism by the Carbon–Nitrogen Status in Tobacco: Nitrate Inhibits Large Sectors of Phenylpropanoid Metabolism. Plant J 46: 533-548
- Galmés J, Ochogavía JM, Gago J, Roldán EJ, Cifre J, Conesa MÀ (2012) Leaf Responses to Drought Stress in Mediterranean Accessions of *Solanum lycopersicum*: Anatomical Adaptations in Relation to Gas-exchange Parameters. Plant Cell Environ: 36: 920–935
- Ghannoum O, Evans JR, Caemmerer S (2011) Chapter 8 Nitrogen and Water Use Efficiency of C₄ Plants - C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms. *In* AS Raghavendra, RF Sage, eds, Vol 32. Springer Netherlands, pp 129-146
- **Godfrey N** (2011) Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models. Plant Sci **181:** 379-386
- Goldemberg J (2007) Ethanol for a sustainable energy future. Sci 315: 808-810
- Grivet L, Arruda P (2002) Sugarcane Genomics: Depicting the Complex Genome of an Important Tropical Crop. Curr Opin Plant Biol 5: 122-127
- Harrington MJ, Mutwil M, Barrière Y, Sibout R (2012) Molecular Biology of Lignification in Grasses. Adv Bot Res; Special Issue: Lignins - biosynthesis, biodegradation and bioengineering 61: 77-112
- Hatfield R, Fukushima RS (2005) Can lignin be accurately measured? Crop Sci 45: 832-839
- Higuchi T (2006) Look Back Over the Studies of Lignin Biochemistry. J Wood Sci 52: 2-8
- Jung H-JG, Varel VH, Weimer PJ, Ralph J (1999) Accuracy of Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Methods As Assessed by Bomb Calorimetry. J Agric Food Chem 47: 2005-2008
- Karkonen A, Warinowski T, Teeri TH, Simola LK, Fry SC (2009) On the mechanism of apoplastic H₂O₂ production during lignin formation and elicitation in cultured spruce cells-peroxidases after elicitation. Planta 230: 553-567
- Karlsson M, Melzer M, Prokhorenko I, Johansson T, Wingsle G (2005) Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in Zinnia elegans. J Exp Bot 56: 2085-2093

- Kimura M, Yamamoto YY, Seki M, Sakurai T, Sato M, Abe T, Yoshida S, Manabe K, Shinozaki K, Matsui M (2003) Identification of *Arabidopsis* Genes Regulated by High Light–Stress Using cDNA Microarray. Photochem Photobiol 77: 226-233
- Kishimoto T, Chiba W, Saito K, Fukushima K, Uraki Y, Ubukata M (2009) Influence of Syringyl to Guaiacyl Ratio on the Structure of Natural and Synthetic Lignins. J Agric Food Chem 58: 895-901
- **Kiyota E, Mazzafera P, Sawaya ACHF** (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
- Kojima S, Bohner A, Wirén N (2006) Molecular mechanisms of urea transport in plants. J Memb Biol 212: 83-91
- Lam H-M, Hsieh M-H, Coruzzi G (1998) Reciprocal Regulation of Distinct Asparagine Synthetase Genes by Light and Metabolites in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16: 345-353
- Lee S, Reth A, Meletzus D, Sevilla M, Kennedy C (2000) Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. J Bacteriol **182**: 7088-7091
- Li X, Weng J-K, Chapple C (2008) Improvement of biomass through lignin modification. Plant J 54: 569-581
- Li Y, Gao Y, Xu X, Shen Q, Guo S (2009) Light-Saturated Photosynthetic Rate in High-Nitrogen Rice (*Oryza sativa* L.) Leaves is Related to Chloroplastic CO₂ Concentration. J Exp Bot **60**: 2351-2360
- Liao Y-C, Wang A-Y (2003) Sugar-Modulated Gene Expression of Sucrose Synthase in Suspension-Cultured Cells of Rice. Physiologia Plantarum 118: 319-327
- Liepman AH, Wightman R, Geshi N, Turner SR, Scheller HV (2010) Arabidopsis a powerful model system for plant cell wall research. The Plant Journal 61: 1107-1121
- Lin SY, Dence CW (1992) Methods in Lignin Chemistry. Springer Series in Wood Science
- Lingle S, Thomson J (2012) Sugarcane Internode Composition During Crop Development. BioEnergy Research 5: 168-178
- Lisboa CC, Butterbach-Bahl K, Mauder M, Kiese R (2011) Bioethanol Production from Sugarcane and Emissions of Greenhouse Gases – Known and Unknowns. GCB Bioenergy 3: 277-292
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nature Protocols 1: 387-396
- **Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-[\Delta][\Delta]CT}$ Method. Methods **25**: 402-408
- Matts J, Jagadeeswaran G, Roe BA, Sunkar R (2010) Identification of microRNAs and their targets in switchgrass, a model biofuel plant species. Journal of Plant Physiology 167: 896-904
- McCormick AJ, Cramer MD, Watt DA (2006) Sink Strength Regulates Photosynthesis in Sugarcane. New Phytologist 171: 759-770
- Möller R, Ball R, Henderson A, Modzel G, Find J (2006) Effect of Light and Activated Charcoal on Tracheary Element Differentiation in Callus Cultures of *Pinus radiata* D. Don. Plant Cell Tissue Organ Cult 85: 161-171
- Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA (2010) Genome-Wide Analysis of Phenylpropanoid Defence Pathways. Mol Plant Pathol 11: 829-846
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiol 147: 1251-1263
- Papini-Terzi F, Rocha F, Vencio R, Felix J, Branco D, Waclawovsky A, Del Bem L, Lembke C, Costa M, Nishiyama M, Vicentini R, Vincentz M, Ulian E, Menossi M, Souza G (2009) Sugarcane Genes Associated with Sucrose Content. BMC Genomics 10: 120
- Patrick JW, Botha FC, Birch RG (2012) Metabolic Engineering of Sugars and Simple Sugar Derivatives in Plants. Plant Biotechnol J 2:142-56

- Peng M, Bi Y-M, Zhu T, Rothstein S (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. Plant Mol Biol 65: 775-797
- Pitre FE, Pollet B, Lafarguette F, Cooke JEK, MacKay JJ, Lapierre C (2007) Effects of Increased Nitrogen Supply on the Lignification of Poplar Wood. J Agric Food Chem 55: 10306-10314
- Polacco JC, Mazzafera P, Tezotto T (2013) Opinion Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. Plant Sci 199–200: 79-90
- **Pomar F, Caballero N, Pedreño MA, Ros Barceló A** (2002) H₂O₂ Generation During the Auto-Oxidation of Coniferyl Alcohol Drives the Oxidase Activity of a Highly Conserved Class III Peroxidase Involved in Lignin Biosynthesis. FEBS Letters **529**: 198-202
- **Portz G, Molin J, Jasper J** (2012) Active crop sensor to detect variability of nitrogen supply and biomass on sugarcane fields. Precision Agriculture **13**: 33-44
- Rae AL, Grof CPL, Casu RE, Bonnett GD (2005) Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem: Pathways and Control Points for Transport and Compartmentation. Field Crops Res 92: 159-168
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. Plant Physiol 133: 1051-1071
- Ralph J (2010) Hydroxycinnamates in lignification. Phytochem Rev 9: 65-83
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett **339:** 62-66
- Roach BT (1972) Nobilisation of Sugarcane. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology 14: 206-216
- Robinson N, Brackin R, Vinall K, Soper F, Holst J, Gamage H, Paungfoo-Lonhienne C, Rennenberg H, Lakshmanan P, Schmidt S (2011) Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. PLoS ONE 6: e19045
- **Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR** (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. Plant Cell **13**: 11-29
- **Rossel JB, Wilson IW, Pogson BJ** (2002) Global Changes in Gene Expression in Response to High Light in *Arabidopsis*. Plant Physiol **130**: 1109-1120
- Rubin EM (2008) Genomics of Cellulosic Biofuels. Nature 454: 841-845
- Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. Plant Physiol **136**: 2483-2499
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *In* S Merchant, WR Briggs, D Ort, eds, Ann Rev Plant Biol, Vol 61, Vol 61. Ann Rev, Palo Alto, pp 263-289
- Schilmiller AL, Stout J, Weng J-K, Humphreys J, Ruegger MO, Chapple C (2009) Mutations in the Cinnamate 4-Hydroxylase Gene Impact Metabolism, Growth and Development in *Arabidopsis*. Plant J **60**: 771-782
- Shen H, He X, Poovaiah CR, Wuddineh WA, Ma J, Mann DGJ, Wang H, Jackson L, Tang Y, Neal Stewart C, Chen F, Dixon RA (2012) Functional Characterization of the Switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB Transcription Factor PvMYB4 for Improvement of Lignocellulosic Feedstocks. New Phytol **193**: 121-136
- Singh K, Kumar S, Rani A, Gulati A, Ahuja P (2009) Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) and Catechins (flavan-3-ols) Accumulation in Tea. Funct Integr Genomics 9: 125-134
- **Somerville C** (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *In* Annual Review of Cell and Developmental Biology, Vol 22. Annual Reviews, Palo Alto, pp 53-78
- Spiertz JHJ (2010) Nitrogen, Sustainable Agriculture and Food Security. A Review. Agron Sustai Dev 30: 43-55

- Srivastava A, Palanichelvam K, Ma J, Steele J, Blancaflor E, Tang Y (2010) Collection and Analysis of Expressed Sequence Tags Derived from Laser Capture Microdissected Switchgrass (*Panicum virgatum*; L. Alamo) Vascular Tissues. BioEnergy Res 3: 278-294
- Stitt M (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. Curr Opin Plant Biol 2: 178-186
- Stitt M, Krapp A (1999) The Interaction Between Elevated Carbon Dioxide and Nitrogen Nutrition: the Physiological and Molecular Background. Plant Cell Environ 22: 583-621
- Stitt M, Müller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible W-R, Krapp A (2002) Steps Towards an Integrated View of Nitrogen Metabolism. J Exp Bot 53: 959-970
- **Su G, An Z, Zhang W, Liu Y** (2005) Light Promotes the Synthesis of Lignin Through the Production of H₂O₂ Mediated by Diamine Oxidases in Soybean Hypocotyls. J Plant Physiol **162**: 1297-1303
- Taiz L, Zeiger E (2002) Fisiologia Vegetal. 3° edição
- Taparia Y, Gallo M, Altpeter F (2012) Comparison of Direct and Indirect Embryogenesis Protocols, Biolistic Gene Transfer and Selection Parameters for Efficient Genetic Transformation of Sugarcane. Plant Cell Tissue Organ Cult 111: 131-141
- Taule C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis VM, Sicardi M, Battistoni F (2012) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. Plant Soil 356: 35-49
- Thomas PW, Woodward FI, Quick WP (2004) Systemic Irradiance Signalling in Tobacco. New Phytol 161: 193-198
- Tosens T, Niinemets Ü, Vislap V, Eichelmann H, Castro DÍEz P (2012) Developmental Changes in Mesophyll Diffusion Conductance and Photosynthetic Capacity under Different Light and Water Availabilities in *Populus tremula*: How Structure Constrains Function. Plant Cell Environ 35: 839-856
- Van der Laan M, Miles N, Annandale J, du Preez C (2011) Identification of opportunities for improved nitrogen management in sugarcane cropping systems using the newly developed canegro-N model. Nutr Cycl Agroecosyst 90: 391-404
- Vanholme R, Morreel K, Darrah C, Oyarce P, Grabber JH, Ralph J, Boerjan W (2012) Metabolic Engineering of Novel Lignin in Biomass Crops. New Phytol 4: 978-1000
- Vitti AC, Cantarella H, Trivelin PCO, Rosseto R (2008) Nitrogênio. In LL Dinardo-Miranda, ACMd Vasconcelos, MGdA Landell, eds, Cana-de-açúcar. Instituto Agronômico, Campinas, p 882
 Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. Mol Plant 3: 2-20
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH, Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. Plant Biotechnol J 8: 263-276
- White LM (1973) Carbohydrate reserves of grasses: a review. J Range Management 26: 13-18
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant Mol Biol 47: 9-27
- Witte C-P (2011) Urea Metabolism in Plants. Plant Sci 180: 431-438
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart Jr CN (2008) Plants to Power: Bioenergy to Fuel the Future. Trends Plant Sci 13: 421-429
- Zeng X-Q, Chow WS, Su L-J, Peng X-X, Peng C-L (2010) Protective Effect of Supplemental Anthocyanins on *Arabidopsis* Leaves under High Light. Physiol Plant **138**: 215-225
- Zhang S-Z, Yang B-P, Feng C-L, Chen R-K, Luo J-P, Cai W-W, Liu F-H (2006) Expression of the Grifola frondosa Trehalose Synthase Gene and Improvement of Drought-Tolerance in Sugarcane (Saccharum officinarum L.). J Integrat Plant Biol 48: 453-459

ANEXO 1

Material Suplementar do Capítulo 2

YR	Control	N1	N2	RL
Amino acids				
Alanine	0.0296 ± 0.0018	1.85 ± 0.37	3.55 ± 0.29	1.31 ± 0.23
Allo-threonine	0.0021 ± 0.0000	1.04 ± 0.09	2.87 ± 0.15	0.62 ± 0.02
Asparagine	0.0004 ± 0.0001	4.44 ± 1.17	34.66 ± 2.77	4.95 ± 1.23
Aspartic acid	0.0188 ± 0.0032	0.85 ± 0.02	2.23 ± 0.12	0.83 ± 0.05
Cysteine	0.0002 ± 0.0000	1.25 ± 0.23	2.22 ± 0.18	0.74 ± 0.13
GABA	0.0095 ± 0.0014	3.16 ± 0.17	1.97 ± 0.30	0.90 ± 0.02
Glutamic acid	0.0179 ± 0.0006	1.36 ± 0.44	1.56 ± 0.22	0.34 ± 0.09
Glutamine	0.0069 ± 0.0004	0.75 ± 0.09	0.90 ± 0.05	0.60 ± 0.06
Glycine	0.0005 ± 0.0000	1.16 ± 0.26	3.38 ± 0.46	0.59 ± 0.05
Ornithine	0.0006 ± 0.0000	2.80 ± 0.65	3.67 ± 0.31	0.75 ± 0.14
Phenylalanine	0.0002 ± 0.0000	1.31 ± 0.30	7.41 ± 0.72	0.84 ± 0.06
Serine	0.0089 ± 0.0017	1.42 ± 0.39	2.68 ± 0.37	0.67 ± 0.02
Tyrosine	0.0057 ± 0.0016	1.13 ± 0.13	3.25 ± 0.27	0.00 ± 0.00
Valine	0.0128 ± 0.0010	2.17 ± 0.07	4.11 ± 0.55	0.47 ± 0.04

Tabela S 1. Quantidade relativa de aminoácidos presentes na região periférica jovem (YR) da variedade IACSP04-065.

Tabela S 2. Quantidade	relativa de aminoáci	dos presentes na região	o central jovem (Y)	P) da variedade
IACSP04-065.				

YP	Control	N1	N2	RL		
Amino acids						
Alanine	0.0169 ± 0.0043	1.53 ± 0.35	2.70 ± 0.68	1.09 ± 0.29		
Allo-threonine	0.0020 ± 0.0009	1.13 ± 0.28	1.44 ± 0.04	0.64 ± 0.15		
Asparagine	0.0001 ± 0.0000	4.81 ± 0.10	45.23 ± 0.06	10.19 ± 0.58		
Aspartic acid	0.0080 ± 0.0012	0.82 ± 0.07	1.69 ± 0.33	1.00 ± 0.09		
Cysteine	0.0002 ± 0.0000	1.21 ± 0.04	2.63 ± 0.45	0.69 ± 0.07		
GABA	0.0071 ± 0.0017	1.53 ± 0.04	1.72 ± 0.25	1.01 ± 0.03		
Glutamic acid	0.0099 ± 0.0035	1.03 ± 0.12	0.85 ± 0.00	0.63 ± 0.01		
Glutamine	0.0075 ± 0.0003	0.83 ± 0.05	0.97 ± 0.07	0.70 ± 0.23		
Glycine	0.0005 ± 0.0001	0.92 ± 0.26	1.87 ± 0.14	0.77 ± 0.19		
Ornithine	0.0008 ± 0.0002	0.41 ± 0.10	2.45 ± 0.83	0.22 ± 0.01		
Phenylalanine	0.0003 ± 0.0001	1.19 ± 0.24	2.20 ± 0.04	1.32 ± 0.11		
Serine	0.0069 ± 0.0013	1.45 ± 0.10	1.87 ± 0.34	0.75 ± 0.29		
Tyrosine	0.0062 ± 0.0016	2.03 ± 0.47	2.90 ± 1.29	3.10 ± 0.22		
Valine	0.0112 ± 0.0028	0.62 ± 0.02	2.72 ± 0.56	0.58 ± 0.01		

Valores das amostras controle apresentados na forma não normalizada em nmol g⁻¹ DW. Os dados dos tratamentos foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados como médias de triplicatas independentes. Valores em negrito indicam diferença significativa obtida pelo teste T de Student (P<0.05) em relação ao controle.

MR	Control	N1	N2	RL
Amino acids				
Alanine	0.0138 ± 0.0022	1.95 ± 0.60	8.83 ± 2.05	0.67 ± 0.08
Allo-threonine	0.0003 ± 0.0001	10.05 ± 0.44	24.33 ± 2.76	0.96 ± 0.15
Asparagine	0.0001 ± 0.0001	246.69 ± 1.38	1,160.26 ± 96.45	5.25 ± 1.45
Aspartic acid	0.0111 ± 0.0003	2.23 ± 0.52	4.09 ± 0.33	0.99 ± 0.13
Cysteine	0.0002 ± 0.0000	2.49 ± 0.69	18.67 ± 0.46	0.77 ± 0.06
GABA	0.0068 ± 0.0006	1.30 ± 0.16	1.94 ± 0.15	0.81 ± 0.09
Glutamic acid	0.0022 ± 0.0004	5.46 ± 0.50	6.57 ± 0.47	1.42 ± 0.46
Glutamine	0.0003 ± 0.0003	15.00 ± 1.88	16.50 ± 2.33	17.58 ± 1.11
Glycine	0.0002 ± 0.0000	5.72 ± 1.10	10.24 ± 2.46	0.81 ± 0.13
Ornithine	0.0011 ± 0.0001	0.33 ± 0.05	2.27 ± 0.24	0.17 ± 0.03
Phenylalanine	0.0002 ± 0.0000	1.14 ± 0.33	2.71 ± 0.07	0.55 ± 0.04
Serine	0.0033 ± 0.0004	3.80 ± 1.61	8.90 ± 1.33	0.64 ± 0.05
Tyrosine	0.0006 ± 0.0002	4.85 ± 0.51	6.29 ± 1.22	8.38 ± 0.65
Valine	0.0050 ± 0.0005	4.33 ± 1.22	12.31 ± 0.64	1.37 ± 0.06

Tabela S 3. Quantidade relativa de aminoácidos presentes na região periférica madura (MR) da variedade IACSP04-065.

MP	Control	N1	N2	RL		
Amino acids						
Alanine	0.0116 ± 0.0016	1.87 ± 0.23	2.77 ± 0.08	1.68 ± 0.77		
Allo-threonine	0.0004 ± 0.0001	2.53 ± 0.20	6.18 ± 1.16	1.08 ± 0.07		
Asparagine	0.0000 ± 0.0000	133.63 ± 49.28	1,019.29 ± 295.74	10.19 ± 2.67		
Aspartic acid	0.0033 ± 0.0002	2.97 ± 0.20	4.81 ± 0.80	2.21 ± 0.44		
Cysteine	0.0002 ± 0.0000	1.06 ± 0.14	4.44 ± 0.12	0.86 ± 0.05		
GABA	0.0045 ± 0.0001	1.46 ± 0.21	2.07 ± 0.20	2.10 ± 0.65		
Glutamic acid	0.0027 ± 0.0014	1.83 ± 0.53	2.78 ± 0.14	1.36 ± 0.22		
Glutamine	0.0040 ± 0.0022	1.47 ± 0.14	1.78 ± 0.13	1.30 ± 0.56		
Glycine	0.0003 ± 0.0000	1.11 ± 0.58	1.77 ± 0.16	1.47 ± 0.54		
Ornithine	0.0018 ± 0.0001	0.57 ± 0.24	0.50 ± 0.01	1.05 ± 0.47		
Phenylalanine	0.0003 ± 0.0000	0.54 ± 0.16	1.72 ± 0.31	0.66 ± 0.08		
Serine	0.0038 ± 0.0004	0.69 ± 0.18	2.25 ± 0.19	1.15 ± 0.46		
Tyrosine	0.0010 ± 0.0004	13.91 ± 1.58	4.79 ± 0.66	6.12 ± 6.12		
Valine	0.0034 ± 0.0010	1.77 ± 0.12	7.11 ± 0.48	1.86 ± 0.24		

Tabela S 4. Quantidade relativa de aminoácidos presentes na região central madura (MP) da variedade IACSP04-065.

Valores das amostras controle apresentados na forma não normalizada em nmol g⁻¹ DW. Os dados dos tratamentos foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados como médias de triplicatas independentes. Valores em negrito indicam diferença significativa obtida pelo teste T de Student (P<0.05) em relação ao controle.

YR	Control	N1	N2	RL		
Amino acids						
Alanine	0.0220 ± 0.0065	1.71 ± 0.02	2.89 ± 0.56	3.03 ± 0.54		
Allo-threonine	0.0016 ± 0.0001	1.19 ± 0.00	2.98 ± 0.33	2.81 ± 0.27		
Asparagine	0.0030 ± 0.0002	1.81 ± 0.00	12.97 ± 0.83	9.12 ± 1.77		
Aspartic acid	0.0164 ± 0.0034	0.95 ± 0.02	1.66 ± 0.30	1.47 ± 0.05		
Cysteine	0.0003 ± 0.0000	1.02 ± 0.00	4.71 ± 0.05	2.05 ± 0.23		
GABA	0.0114 ± 0.0006	1.73 ± 0.01	1.45 ± 0.12	1.94 ± 0.76		
Glutamic acid	0.0131 ± 0.0022	0.75 ± 0.01	1.20 ± 0.10	1.04 ± 0.18		
Glutamine	0.0044 ± 0.0000	1.15 ± 0.00	1.49 ± 0.17	1.50 ± 0.05		
Glycine	0.0003 ± 0.0000	1.37 ± 0.00	2.92 ± 0.34	3.60 ± 0.37		
Ornithine	0.0006 ± 0.0001	0.69 ± 0.00	1.95 ± 0.20	1.13 ± 0.10		
Phenylalanine	0.0003 ± 0.0000	1.49 ± 0.00	3.26 ± 0.25	3.29 ± 0.34		
Serine	0.0069 ± 0.0003	0.82 ± 0.01	2.08 ± 0.30	2.04 ± 0.22		
Tyrosine	0.0000 ± 0.0000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
Valine	0.0077 ± 0.0006	5.27 ± 0.01	3.54 ± 1.84	7.05 ± 0.67		

Tabela S 5. Quantidade relativa de aminoácidos presentes na região periférica jovem (YR) da variedade IACSP04-627.

	VP	Cor	trol	N1		N2		BI
IACSP04-6	527.							
Tabela S 6	6. Quantidade	relativa de	aminoácidos	presentes 1	na região	central jover	m (YP) da	variedade

YP	Control	N1	N2	RL			
Amino acids							
Alanine	0.0348 ± 0.0018	0.37 ± 0.01	2.43 ± 0.08	1.29 ± 0.14			
Allo-threonine	0.0007 ± 0.0001	1.19 ± 0.07	12.95 ± 0.99	6.92 ± 1.20			
Asparagine	0.0012 ± 0.0002	1.00 ± 0.07	54.12 ± 0.85	22.68 ± 4.70			
Aspartic acid	0.0112 ± 0.0001	0.57 ± 0.16	0.60 ± 0.04	1.24 ± 0.08			
Cysteine	0.0002 ± 0.0000	1.76 ± 0.46	7.24 ± 1.86	3.78 ± 0.53			
GABA	0.0088 ± 0.0006	0.82 ± 0.04	1.85 ± 0.35	1.43 ± 0.06			
Glutamic acid	0.0082 ± 0.0024	0.50 ± 0.04	0.92 ± 0.00	1.35 ± 0.15			
Glutamine	0.0064 ± 0.0006	1.43 ± 0.19	1.03 ± 0.07	1.20 ± 0.02			
Glycine	0.0005 ± 0.0001	0.69 ± 0.00	4.00 ± 1.29	2.66 ± 0.42			
Ornithine	0.0004 ± 0.0001	0.94 ± 0.18	3.72 ± 0.49	1.24 ± 0.06			
Phenylalanine	0.0005 ± 0.0001	0.97 ± 0.23	4.30 ± 0.22	3.83 ± 0.48			
Serine	0.0090 ± 0.0001	0.44 ± 0.04	2.03 ± 0.48	1.49 ± 0.19			
Tyrosine	0.0151 ± 0.0003	1.02 ± 0.19	0.97 ± 0.17	1.01 ± 0.07			
Valine	0.0070 ± 0.0004	3.84 ± 1.06	2.14 ± 0.20	7.70 ± 0.91			

Valores das amostras controle apresentados na forma não normalizada em nmol g^{-T} DW. Os dados dos tratamentos foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados como médias de triplicatas independentes. Valores em negrito indicam diferença significativa obtida pelo teste T de Student (P<0.05) em relação ao controle.

	*=			
MR	Control	N1	N2	RL
Amino acids				
Alanine	0.0239 ± 0.0136	1.07 ± 0.30	34.94 ± 3.42	2.48 ± 0.31
Allo-threonine	0.0002 ± 0.0000	2.52 ± 0.75	82.44 ± 8.10	4.68 ± 0.69
Asparagine	0.0016 ± 0.0016	3.02 ± 1.54	27.37 ± 1.33	0.83 ± 0.03
Aspartic acid	0.0045 ± 0.0015	3.89 ± 0.87	13.02 ± 1.62	4.23 ± 0.22
Cysteine	0.0003 ± 0.0001	0.98 ± 0.13	8.91 ± 2.22	0.73 ± 0.10
GABA	0.0075 ± 0.0009	1.16 ± 0.02	8.22 ± 0.39	2.02 ± 0.08
Glutamic acid	0.0026 ± 0.0008	1.18 ± 0.31	10.43 ± 1.86	2.76 ± 0.26
Glutamine	0.0019 ± 0.0007	0.19 ± 0.00	13.12 ± 1.51	1.36 ± 0.41
Glycine	0.0002 ± 0.0000	1.11 ± 0.10	24.88 ± 4.60	1.59 ± 0.33
Ornithine	0.0002 ± 0.0000	1.30 ± 0.48	6.55 ± 0.30	2.02 ± 0.20
Phenylalanine	0.0002 ± 0.0000	2.02 ± 0.31	15.33 ± 3.22	2.79 ± 0.22
Serine	0.0020 ± 0.0000	2.68 ± 0.50	49.36 ± 1.10	5.22 ± 1.08
Tyrosine	0.0000 ± 0.0000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Valine	0.0070 ± 0.0004	0.91 ± 0.09	2.93 ± 0.04	1.77 ± 0.23

Tabela S 7. Quantidade relativa de aminoácidos presentes na região periférica madura (MR) da variedade IACSP04-627.

MP	Control	N1	N2	RL			
Amino acids							
Alanine	0.0136 ± 0.0024	0.66 ± 0.03	73.56 ± 9.44	1.76 ± 0.05			
Allo-threonine	0.0003 ± 0.0001	1.15 ± 0.42	46.31 ± 3.16	1.35 ± 0.12			
Asparagine	0.0001 ± 0.0001	1.01 ± 0.25	403.22 ± 77.88	1.95 ± 0.33			
Aspartic acid	0.0077 ± 0.0033	0.97 ± 0.02	7.99 ± 0.02	1.89 ± 0.14			
Cysteine	0.0002 ± 0.0000	0.86 ± 0.04	13.36 ± 1.47	1.55 ± 0.60			
GABA	0.0070 ± 0.0008	1.43 ± 0.23	4.57 ± 0.36	1.06 ± 0.05			
Glutamic acid	0.0016 ± 0.0003	1.48 ± 0.59	13.16 ± 0.22	3.70 ± 0.44			
Glutamine	0.0040 ± 0.0001	0.75 ± 0.27	3.95 ± 0.77	1.23 ± 0.10			
Glycine	0.0003 ± 0.0001	0.77 ± 0.27	16.54 ± 2.96	0.80 ± 0.20			
Ornithine	0.0003 ± 0.0003	0.96 ± 0.29	2.58 ± 0.28	0.50 ± 0.05			
Phenylalanine	0.0002 ± 0.0001	0.82 ± 0.12	12.31 ± 1.85	2.11 ± 0.26			
Serine	0.0038 ± 0.0011	0.78 ± 0.22	20.19 ± 1.60	0.99 ± 0.08			
Tyrosine	0.0040 ± 0.0002	0.39 ± 0.18	2.99 ± 0.58	0.53 ± 0.03			
Valine	0.0069 ± 0.0010	0.81 ± 0.07	7.18 ± 3.98	1.18 ± 0.05			

Tabela S 8. Quantidade relativa de aminoácidos presentes na região central madura (MP) da variedade IACSP04-627.

Valores das amostras controle apresentados na forma não normalizada em nmol g^{-1} DW. Os dados dos tratamentos foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados como médias de triplicatas independentes. Valores em negrito indicam diferença significativa obtida pelo teste T de Student (P<0.05) em relação ao controle.

YR	Control	N1]	N2	RL
Acids and hydroxy acids					
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.6416 ± 0.	.5193 0.34 ±	0.02 0.37	± 0.02	0.41 ± 0.04
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0033 ± 0.0000	.0011 0.02 ±	0.01 4.64	± 0.63	0.04 ± 0.00
Fumaric acid	0.0006 ± 0.0006	.0001 0.66 ±	0.07 0.95	± 0.35	0.59 ± 0.07
Glucuronic acid	0.0049 ± 0.0000	.0015 1.39 ±	0.04 0.62	± 0.09	0.04 ± 0.01
Glyceric acid	0.0035 ± 0.0000	.0004 1.00 ±	0.11 1.12	± 0.23	0.94 ± 0.12
Glycolic acid	0.0014 ± 0.0014	.0001 0.79 ±	0.02 0.53	± 0.00	0.95 ± 0.00
Malic acid	0.0501 ± 0.000	.0068 0.67 ±	0.07 0.61	± 0.04	0.77 ± 0.12
Phosphoric acid	0.0437 ± 0.000	.0100 0.63 ±	0.09 0.59	± 0.14	0.62 ± 0.05
Pyruvic acid	0.0005 ± 0.0005	.0001 1.00 ±	0.09 1.44	± 0.16	1.37 ± 0.53
Quinic acid	0.1672 ± 0.1672	.0029 0.75 ±	0.17 0.77	± 0.12	0.74 ± 0.01
Succinic acid	0.0017 0.	.0005 1.00	0.25 1.08	0.21	0.82 0.04

Tabela S 9. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região periférica jovem (YR) da variedade IACSP04-065.

Tabela S 10. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região central jovem (YP) da variedade IACSP04-065.

YP	Control		N1			N2			RL		
Acids and hydroxy acids											
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.3331 ±	0.2513	0.96	±	0.02	0.90	±	0.03	0.95	±	0.04
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0125 ±	0.0030	0.02	±	0.00	1.17	±	0.08	0.01	±	0.00
Fumaric acid	$0.0005 \pm$	0.0000	0.72	±	0.10	0.56	±	0.01	0.58	±	0.05
Glucuronic acid	0.0089 ±	0.0008	0.01	±	0.00	1.59	±	0.02	0.02	±	0.00
Glyceric acid	0.0019 ±	0.0000	0.91	±	0.07	0.90	±	0.10	0.80	±	0.12
Glycolic acid	0.0008 ±	0.0000	0.90	±	0.06	0.67	±	0.01	0.65	±	0.04
Malic acid	$0.0233 \pm$	0.0014	0.66	±	0.07	0.73	±	0.02	0.84	±	0.11
Phosphoric acid	0.0187 ±	0.0009	0.80	±	0.10	0.51	±	0.04	0.86	±	0.01
Pyruvic acid	$0.0005 \pm$	0.0000	0.83	±	0.36	0.93	±	0.16	0.33	±	0.06
Quinic acid	0.1614 ±	0.0055	0.74	±	0.13	0.46	±	0.05	0.79	±	0.05
Succinic acid	0.0014	0.0005	0.99		0.03	0.91		0.20	0.57		0.01

Valores das amostras controle apresentados na forma não normalizada em nmol g^{-1} DW. Os dados dos tratamentos foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados como médias de triplicatas independentes. Valores em negrito indicam diferença significativa obtida pelo teste T de Student (P<0.05) em relação ao controle.

MR	Contro	ol	N1			N2			RL		
Acids and hydroxy acids											
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.3296 ±	0.2723	0.88	±	0.05	0.99	±	0.02	0.93	±	0.10
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0018 ±	0.0003	0.17	±	0.05	0.13	±	0.03	0.12	±	0.01
Fumaric acid	$0.0003 \pm$	0.0000	0.63	±	0.05	0.57	±	0.04	0.73	±	0.04
Glucuronic acid	$0.0008 \pm$	0.0004	0.25	±	0.01	2.58	±	0.36	0.25	±	0.04
Glyceric acid	$0.0005 \pm$	0.0001	1.86	±	0.28	1.42	±	0.31	1.56	±	0.13
Glycolic acid	0.0008 ±	0.0000	0.83	±	0.06	0.65	±	0.08	0.88	±	0.14
Malic acid	0.0049 ±	0.0012	2.20	±	0.38	1.45	±	0.20	6.54	±	1.69
Phosphoric acid	0.2184 ±	0.0180	0.80	±	0.17	0.32	±	0.07	1.23	±	0.09
Pyruvic acid	0.0004 ±	0.0001	0.95	±	0.36	1.21	±	0.14	0.57	±	0.03
Quinic acid	$0.0023 \pm$	0.0007	12.59	±	2.51	7.42	±	1.24	20.17	±	6.87
Succinic acid	0.0002	0.0001	1.32		0.23	1.32		0.30	1.27		0.27

Tabela S 11. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região periférica madura (MR) da variedade IACSP04-065.

Tabela S 12. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região central madura (MP) da variedade IACSP04-065.

MP	Control		N1			N2			RL		
Acids and hydroxy acids											
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.2768 ±	0.244	1.13	±	0.06	1.16	±	0.06	0.98	±	0.08
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0006 ±	0.001	0.40	±	0.14	0.97	±	0.46	0.25	±	0.05
Fumaric acid	0.0002 ±	0.000	0.97	±	0.36	0.70	±	0.04	0.78	±	0.05
Glucuronic acid	0.0001 ±	0.000	20.72	±	19.40	104.30	±	10.91	1.01	±	0.22
Glyceric acid	0.0002 ±	0.000	2.41	±	1.03	2.18	±	0.36	3.24	±	0.10
Glycolic acid	$0.0005 \pm$	0.000	1.16	±	0.30	0.91	±	0.04	0.83	±	0.10
Malic acid	$0.0033 \pm$	0.001	1.50	±	0.50	1.57	±	0.15	1.50	±	0.03
Phosphoric acid	$0.0905 \pm$	0.003	0.06	±	0.01	0.03	±	0.00	0.58	±	0.06
Pyruvic acid	0.0004 ±	0.000	0.43	±	0.02	0.80	±	0.19	0.80	±	0.30
Quinic acid	$0.0535 \pm$	0.017	0.79	±	0.05	0.47	±	0.04	1.56	±	0.07
Succinic acid	0.0002	0.000	1.25		0.14	0.96		0.17	0.92		0.20

Valores das amostras controle apresentados na forma não normalizada em nmol g^{-1} DW. Os dados dos tratamentos foram normalizados pela média calculada para a amostra controle. Valores apresentados como médias de triplicatas independentes. Valores em negrito indicam diferença significativa obtida pelo teste T de Student (P<0.05) em relação ao controle.
YR	Contro	1	N	N1	Ν	12	F	X L
Acids and hydroxy acids								
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.7352 ± 0	0.4085	0.78	± 0.52	0.76	± 0.05	0.73	± 0.04
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0002 ± 0	0.0000	12.99	± 0.00	1.11	± 0.22	23.13	± 0.04
Fumaric acid	0.0003 ± 0	0.0000	1.54	± 0.00	1.36	± 0.43	1.38	± 0.11
Glucuronic acid	0.0003 ± 0	0.0000	16.13	± 0.00	0.81	± 0.02	11.78	± 1.87
Glyceric acid	0.0024 ± 0	0.0005	1.00	± 0.00	0.59	± 0.04	1.21	± 0.37
Glycolic acid	0.0013 ± 0	0.0002	1.20	± 0.00	0.33	± 0.00	0.90	± 0.03
Malic acid	0.0442 ± 0	0.0046	0.75	± 0.04	0.76	± 0.12	0.99	± 0.04
Phosphoric acid	0.0448 ± 0	0.0125	0.70	± 0.04	0.34	± 0.06	1.87	± 0.40
Pyruvic acid	0.0005 ± 0	0.0001	1.61	± 0.00	0.57	± 0.02	1.01	± 0.28
Quinic acid	0.1204 ± 0.1204	0.0028	1.07	± 0.12	1.02	± 0.01	1.02	± 0.03
Succinic acid	0.0013	0.0001	0.96	0.00	0.68	0.02	0.94	0.05

Tabela S 13. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região periférica (YR) jovem da variedade IACSP04-627.

Tabela S 14. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região central (YP) jovem da variedade IACSP04-627.

ҮР	Control		ľ	N1			N2		I	RL	
Acids and hydroxy acids											
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	$0.4687 \pm$	0.41	0.93	±	0.07	1.19	±	0.26	1.01	±	0.02
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0002 ±	0.00	20.47	±	0.25	0.98	±	0.21	8.03	±	0.04
Fumaric acid	0.0002 ±	0.00	2.57	±	0.35	1.95	±	0.24	2.23	±	0.06
Glucuronic acid	0.0002 ±	0.00	116.75	±	50.32	23.76	±	11.88	67.39	±	2.83
Glyceric acid	0.0016 ±	0.00	0.89	±	0.14	1.01	±	0.21	1.05	±	0.15
Glycolic acid	0.0004 ±	0.00	3.33	±	0.07	1.28	±	0.20	1.75	±	0.20
Malic acid	0.0155 ±	0.01	0.91	±	0.10	1.07	±	0.29	1.37	±	0.27
Phosphoric acid	$0.0205 \pm$	0.00	1.35	±	0.30	0.75	±	0.12	1.71	±	0.14
Pyruvic acid	0.0004 ±	0.00	0.64	±	0.04	0.80	±	0.34	0.58	±	0.07
Quinic acid	0.1114 ±	0.01	1.10	±	0.11	0.82	±	0.03	0.91	±	0.05
Succinic acid	0.0010	0.00	1.12	(0.14	1.26		0.36	1.09		0.03

MR	Control	N1	N	2 RL
Acids and hydroxy acids				
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.4436 ± 0.6	5980 0.59 ±	0.02 0.63	± 0.08 0.62 ± 0.02
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0003 ± 0.0	0001 7.78 ±	4.05 4.30 ±	± 2.17 4.49 ± 1.47
Fumaric acid	0.0001 ± 0.0	$2.63 \pm$	0.75 1.44	± 0.37 2.09 ± 0.13
Glucuronic acid	0.0002 ± 0.0	0000 1.20 ±	0.16 0.85 ±	± 0.19 1.36 ± 0.50
Glyceric acid	0.0005 ± 0.0	0001 1.15 ±	0.26 0.74 ±	± 0.04 2.03 ± 0.23
Glycolic acid	0.0004 ± 0.0	0001 1.35 ±	0.38 0.97 ±	± 0.30 1.34 ± 0.11
Malic acid	0.0042 ± 0.0	0012 3.37 ±	0.08 1.08 ±	± 0.27 5.20 ± 0.49
Phosphoric acid	0.2663 ± 0.0	0030 0.48 ±	0.05 0.11 ±	$\pm 0.04 \qquad 0.84 \pm 0.01$
Pyruvic acid	0.0002 ± 0.0	0001 1.30 ±	0.38 1.00 ±	± 0.12 1.00 ± 0.05
Quinic acid	0.0401 ± 0.0	0017 0.63 ±	0.19 0.49	0.07 1.42 ± 0.20
Succinic acid	0.0002 0.0	0000 2.00	0.58 1.19	0.19 1.68 0.12

Tabela S 15 Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região periférica (MR) madura da variedade IACSP04-627.

Tabela S 16. Quantidade relativa de ácidos orgânicos presentes na região central (MP) madura da variedade IACSP04-627.

MP	Control	N1	N2	RL
Acids and hydroxy acids				
9-(Z)-n-hexadecenoic acid	0.4082 ± 0.39	$21 1.01 \pm 0.06$	0.91 ± 0.19	1.25 ± 0.20
cis-3-caffeoyl-quinic acid	0.0002 ± 0.00	$0.00 0.33 \pm 0.33$	1.75 ± 0.67	0.00 ± 0.00
Fumaric acid	0.0001 ± 0.00	00 2.86 ± 0.61	3.25 ± 0.92	2.49 ± 0.23
Glucuronic acid	0.0001 ± 0.00	1.07 ± 0.09	1.07 ± 0.05	14.55 ± 2.90
Glyceric acid	0.0004 ± 0.00	0.91 ± 0.31	1.26 ± 0.25	0.79 ± 0.01
Glycolic acid	0.0004 ± 0.00	00 2.33 \pm 0.17	1.10 ± 0.27	1.24 ± 0.07
Malic acid	0.0022 ± 0.00	02 0.28 ± 0.01	1.50 ± 0.06	1.94 ± 0.31
Phosphoric acid	0.1139 ± 0.00	62 0.49 ± 0.08	0.15 ± 0.04	1.64 ± 0.11
Pyruvic acid	0.0001 ± 0.00	1.89 ± 0.32	2.43 ± 0.64	2.27 ± 0.34
Quinic acid	0.0792 ± 0.00	014 0.66 ± 0.10	0.72 ± 0.16	1.30 ± 0.13
Succinic acid	0.0001 0.00	00 1.57 0.26	1.80 0.33	1.43 0.10

YR	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.9661 ± 0.0204	0.68 ± 0.04	0.69 ± 0.03	0.65 ± 0.02
Fucose	0.0036 ± 0.0005	0.94 ± 0.00	0.99 ± 0.07	1.06 ± 0.28
Galactose	0.0070 ± 0.0003	2.51 ± 0.39	1.70 ± 0.07	1.81 ± 0.01
Glucose	2.3318 ± 0.5557	0.52 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.60 ± 0.04
Glucosone, 3-deoxy-	0.0028 ± 0.0006	1.66 ± 0.65	1.79 ± 0.69	0.13 ± 0.02
Kestose	0.0021 ± 0.0003	0.48 ± 0.06	0.40 ± 0.01	0.69 ± 0.04
Maltose	0.0142 ± 0.0006	0.82 ± 0.05	0.59 ± 0.14	0.78 ± 0.09
Mannose	0.0217 ± 0.0021	0.81 ± 0.06	0.80 ± 0.03	0.71 ± 0.06
Melezitose	0.0003 ± 0.0000	3.63 ± 0.70	2.19 ± 0.18	1.74 ± 0.00
Raffinose	0.0005 ± 0.0001	7.69 ± 6.79	0.96 ± 0.10	13.38 ± 0.97
Sucrose	1.2716 ± 0.2035	0.45 ± 0.25	1.01 ± 0.05	1.03 ± 0.01
Turanose	0.0001 ± 0.0000	1.46 ± 0.25	7.40 ± 2.32	1.38 ± 0.00
Xylose	0.0156 ± 0.0014	5.88 ± 0.69	0.97 ± 0.11	1.11 ± 0.11
Xylulose	0.0036 ± 0.0005	0.90 ± 0.04	0.97 ± 0.14	0.97 ± 0.12
α-α-trehalose	0.0001 ± 0.0000	11.28 ± 0.00	1.68 ± 0.24	11.27 ± 0.19

Tabela S 17. Quantidade relativa de açúcares presentes na região periférica jovem (YR) da variedade IACSP04-065.

YP	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.9305 ± 0.0349	1.27 ± 0.02	1.24 ± 0.06	1.25 ± 0.06
Fucose	0.0038 ± 0.0004	0.91 ± 0.05	1.15 ± 0.03	0.88 ± 0.04
Galactose	0.0074 ± 0.0009	1.00 ± 0.01	1.08 ± 0.08	1.09 ± 0.03
Glucose	2.5907 ± 1.0261	0.64 ± 0.01	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.05
Glucosone, 3-deoxy-	0.0013 ± 0.0001	0.51 ± 0.04	2.65 ± 0.08	0.45 ± 0.03
Kestose	0.0025 ± 0.0003	0.72 ± 0.01	0.69 ± 0.06	0.66 ± 0.02
Maltose	0.0062 ± 0.0002	2.25 ± 0.06	4.24 ± 0.05	2.15 ± 0.17
Mannose	0.0160 ± 0.0045	2.23 ± 0.01	2.33 ± 0.13	2.28 ± 0.11
Melezitose	0.0006 ± 0.0001	1.59 ± 0.04	0.57 ± 0.00	1.23 ± 0.13
Raffinose	0.0008 ± 0.0002	12.47 ± 1.40	1.31 ± 0.11	8.48 ± 0.53
Sucrose	1.4095 ± 0.1830	0.70 ± 0.01	0.98 ± 0.04	0.92 ± 0.06
Turanose	0.0002 ± 0.0000	1.07 ± 0.11	2.86 ± 0.06	0.66 ± 0.02
Xylose	0.0135 ± 0.0006	1.01 ± 0.03	1.19 ± 0.16	0.76 ± 0.09
Xylulose	0.0033 ± 0.0001	1.12 ± 0.05	1.11 ± 0.04	0.99 ± 0.13
α-α-trehalose	0.0001 ± 0.0001	26.94 ± 3.48	6.06 ± 0.72	21.74 ± 2.08

Tabela S 18. Quantidade relativa de açúcares presentes na região central jovem (YP) da variedade IACSP04-065.

MR	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.0425 ± 0.0022	8.19 ± 1.13	14.96 ± 0.63	9.32 ± 1.14
Fucose	0.0002 ± 0.0000	8.30 ± 1.45	9.36 ± 1.46	8.72 ± 0.94
Galactose	0.0020 ± 0.0000	4.24 ± 0.57	4.08 ± 0.20	4.23 ± 0.39
Glucose	0.1201 ± 0.0066	9.31 ± 0.28	11.37 ± 0.21	10.97 ± 0.42
Glucosone, 3-deoxy-	0.0006 ± 0.0000	0.72 ± 0.14	3.76 ± 0.60	0.55 ± 0.16
Kestose	0.0040 ± 0.0007	0.63 ± 0.11	0.75 ± 0.03	0.67 ± 0.10
Maltose	0.0012 ± 0.0001	3.49 ± 0.35	3.21 ± 0.59	1.34 ± 0.22
Mannose	0.0007 ± 0.0000	8.98 ± 1.55	19.54 ± 2.01	10.16 ± 1.50
Melezitose	0.0022 ± 0.0001	0.34 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.33 ± 0.00
Raffinose	0.0018 ± 0.0003	0.78 ± 0.04	0.78 ± 0.02	0.12 ± 0.03
Sucrose	1.6806 ± 0.0820	0.94 ± 0.08	1.02 ± 0.02	1.10 ± 0.08
Turanose	0.0004 ± 0.0001	0.99 ± 0.28	4.59 ± 0.57	0.94 ± 0.30
Xylose	0.0055 ± 0.0009	1.14 ± 0.17	1.11 ± 0.12	0.76 ± 0.15
Xylulose	0.0005 ± 0.0000	3.08 ± 0.40	4.19 ± 1.12	2.73 ± 0.23
α-α-trehalose	0.0003 ± 0.0000	1.99 ± 0.40	2.09 ± 0.06	2.65 ± 0.33

Tabela S 19. Quantidade relativa de açúcares presentes na região periférica madura (MR) da variedade IACSP04-065.

МР	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.0327 ± 0.0138	33.04 ± 2.72	36.22 ± 1.70	29.75 ± 3.12
Fucose	0.0002 ± 0.0000	11.37 ± 3.72	10.39 ± 0.74	10.39 ± 0.50
Galactose	0.0011 ± 0.0002	6.15 ± 0.57	8.23 ± 0.43	11.47 ± 1.96
Glucose	0.7384 ± 0.3780	2.24 ± 0.05	2.27 ± 0.07	1.93 ± 0.18
Glucosone, 3-deoxy-	0.0007 ± 0.0002	0.66 ± 0.17	0.66 ± 0.09	0.81 ± 0.21
Kestose	0.0053 ± 0.0001	0.83 ± 0.05	1.10 ± 0.18	0.78 ± 0.10
Maltose	0.0014 ± 0.0001	2.96 ± 1.21	3.58 ± 1.16	2.74 ± 0.77
Mannose	0.0167 ± 0.0091	1.90 ± 0.29	2.24 ± 0.16	1.80 ± 0.19
Melezitose	0.0005 ± 0.0001	4.45 ± 0.63	2.39 ± 2.20	3.33 ± 0.66
Raffinose	0.0159 ± 0.0071	0.11 ± 0.04	0.18 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Sucrose	1.5105 ± 0.0692	1.17 ± 0.04	1.16 ± 0.04	0.94 ± 0.24
Turanose	0.0007 ± 0.0006	0.32 ± 0.09	0.48 ± 0.24	1.13 ± 0.37
Xylose	0.0020 ± 0.0000	2.54 ± 0.53	3.14 ± 0.31	2.47 ± 0.43
Xylulose	0.0005 ± 0.0000	5.39 ± 1.02	4.37 ± 0.60	5.34 ± 0.44
α - α -trehalose	0.0004 ± 0.0000	1.71 ± 0.31	1.31 ± 0.08	1.39 ± 0.03

Tabela S 20. Quantidade relativa de açúcares presentes na região central madura (MP) da variedade IACSP04-065.

YR	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	1.1105 ± 0.0584	1.06 ± 1.11	1.07 ± 0.04	0.63 ± 0.02
Fucose	0.0030 ± 0.0001	1.30 ± 0.00	1.02 ± 0.09	1.15 ± 0.12
Galactose	0.0100 ± 0.0005	1.04 ± 0.01	1.05 ± 0.03	0.60 ± 0.02
Glucose	1.3315 ± 0.1744	1.17 ± 1.33	1.16 ± 0.03	0.93 ± 0.02
Glucosone, 3-deoxy-	0.0003 ± 0.0000	18.64 ± 0.00	1.51 ± 0.10	13.41 ± 1.77
Kestose	0.0013 ± 0.0002	0.91 ± 0.00	1.11 ± 0.16	0.56 ± 0.06
Maltose	0.0182 ± 0.0035	0.71 ± 0.02	1.49 ± 0.02	0.19 ± 0.06
Mannose	0.0113 ± 0.0003	1.00 ± 0.01	0.92 ± 0.13	0.87 ± 0.08
Melezitose	0.0005 ± 0.0000	0.81 ± 0.00	1.22 ± 0.16	25.46 ± 0.61
Raffinose	0.0168 ± 0.0055	0.03 ± 0.02	1.19 ± 0.07	0.02 ± 0.01
Sucrose	1.3043 ± 0.1067	1.03 ± 1.30	0.86 ± 0.02	0.67 ± 0.28
Turanose	0.0000 ± 0.0000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Xylose	0.0112 ± 0.0005	0.92 ± 0.01	0.93 ± 0.13	0.64 ± 0.01
Xylulose	0.0029 ± 0.0000	0.90 ± 0.00	0.93 ± 0.20	0.75 ± 0.07
α-α-trehalose	0.0014 ± 0.0001	0.72 ± 0.00	0.79 ± 0.11	0.15 ± 0.00

Tabela S 21. Quantidade relativa de açúcares presentes na região periférica jovem (YR) da variedade IACSP04-627.

YP	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.0629 ± 0.0180	2.32 ± 0.01	1.63 ± 0.14	17.82 ± 0.54
Fucose	0.0032 ± 0.0001	1.11 ± 0.11	0.99 ± 0.12	1.31 ± 0.12
Galactose	0.0006 ± 0.0001	1.91 ± 0.05	1.27 ± 0.40	16.88 ± 0.41
Glucose	0.1863 ± 0.0514	2.38 ± 0.21	1.73 ± 0.24	8.03 ± 0.26
Glucosone, 3-deoxy-	0.0006 ± 0.0001	5.12 ± 1.50	0.87 ± 0.09	5.18 ± 0.75
Kestose	0.0026 ± 0.0007	0.73 ± 0.05	0.75 ± 0.13	0.39 ± 0.02
Maltose	0.0012 ± 0.0003	0.85 ± 0.34	0.88 ± 0.11	6.72 ± 0.70
Mannose	0.0007 ± 0.0000	1.55 ± 0.11	1.48 ± 0.13	15.95 ± 1.73
Melezitose	0.0012 ± 0.0000	9.80 ± 0.42	0.32 ± 0.04	4.79 ± 0.57
Raffinose	0.0114 ± 0.0005	0.02 ± 0.00	0.74 ± 0.08	0.01 ± 0.00
Sucrose	1.2922 ± 0.2504	1.25 ± 0.08	1.27 ± 0.01	0.89 ± 0.03
Turanose	0.0001 ± 0.0000	3.64 ± 1.82	9.09 ± 3.65	9.85 ± 1.53
Xylose	0.0034 ± 0.0007	0.81 ± 0.03	0.40 ± 0.07	2.59 ± 0.17
Xylulose	0.0003 ± 0.0000	0.68 ± 0.68	2.15 ± 0.35	6.95 ± 0.28
α-α-trehalose	0.0013 ± 0.0001	0.29 ± 0.16	0.89 ± 0.29	0.20 ± 0.02

Tabela S 22. Quantidade relativa de açúcares presentes na região central jovem (YP) da variedade IACSP04-627.

MR	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.4274 ± 0.0389	1.29 ± 0.04	1.46 ± 0.07	0.24 ± 0.07
Fucose	0.0004 ± 0.0001	1.09 ± 0.24	1.21 ± 0.15	1.07 ± 0.19
Galactose	0.0032 ± 0.0003	1.37 ± 0.08	1.71 ± 0.08	0.35 ± 0.04
Glucose	0.9664 ± 0.0487	1.18 ± 0.04	1.40 ± 0.00	0.38 ± 0.15
Glucosone, 3-deoxy-	0.0005 ± 0.0001	0.77 ± 0.29	1.44 ± 0.08	0.38 ± 0.15
Kestose	0.0018 ± 0.0000	0.99 ± 0.10	1.18 ± 0.02	2.02 ± 0.26
Maltose	0.0027 ± 0.0005	1.28 ± 0.16	0.75 ± 0.08	0.73 ± 0.16
Mannose	0.0011 ± 0.0001	1.52 ± 0.29	39.21 ± 38.28	1.39 ± 0.22
Melezitose	0.0010 ± 0.0004	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.13	0.38 ± 0.03
Raffinose	0.0054 ± 0.0019	0.06 ± 0.00	0.23 ± 0.04	0.08 ± 0.01
Sucrose	1.7079 ± 0.1150	0.90 ± 0.03	0.86 ± 0.08	0.95 ± 0.03
Turanose	0.0004 ± 0.0000	1.31 ± 0.44	0.90 ± 0.26	0.25 ± 0.03
Xylose	0.0035 ± 0.0006	0.99 ± 0.07	0.73 ± 0.10	0.98 ± 0.23
Xylulose	0.0005 ± 0.0000	1.32 ± 0.17	1.65 ± 0.08	1.26 ± 0.13
α-α-trehalose	0.0004 ± 0.0001	1.10 ± 0.21	0.89 ± 0.18	0.99 ± 0.06

Tabela S 23. Quantidade relativa de açúcares presentes na região periférica madura (MR) da variedade IACSP04-627.

MP	Control	N1	N2	RL
Sugars				
Fructose	0.7612 ± 0.0206	1.13 ± 0.02	0.96 ± 0.12	0.66 ± 0.01
Fucose	0.0005 ± 0.0001	1.27 ± 0.36	1.80 ± 0.16	2.58 ± 0.03
Galactose	0.0059 ± 0.0001	1.21 ± 0.01	1.03 ± 0.12	0.66 ± 0.01
Glucose	1.3139 ± 0.0159	1.01 ± 0.05	0.87 ± 0.13	0.83 ± 0.02
Glucosone, 3-deoxy-	0.0007 ± 0.0000	1.00 ± 0.18	1.17 ± 0.04	0.18 ± 0.01
Kestose	0.0012 ± 0.0001	1.61 ± 0.14	1.11 ± 0.08	3.06 ± 0.09
Maltose	0.0041 ± 0.0008	1.68 ± 0.19	1.04 ± 0.08	0.47 ± 0.04
Mannose	0.0055 ± 0.0001	2.85 ± 0.70	2.55 ± 0.22	0.24 ± 0.01
Melezitose	0.0007 ± 0.0000	0.50 ± 0.19	0.52 ± 0.14	0.28 ± 0.05
Raffinose	0.0000 ± 0.0000	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Sucrose	1.2598 ± 0.0251	1.05 ± 0.00	0.90 ± 0.12	1.32 ± 0.08
Turanose	0.0012 ± 0.0000	0.20 ± 0.00	1.06 ± 0.26	0.15 ± 0.02
Xylose	0.0081 ± 0.0010	1.36 ± 0.23	1.06 ± 0.01	0.33 ± 0.08
Xylulose	0.0022 ± 0.0002	1.62 ± 0.25	1.07 ± 0.08	0.20 ± 0.01
α - α -trehalose	0.0005 ± 0.0001	2.72 ± 0.34	0.88 ± 0.14	2.39 ± 0.26

Tabela S 24. Quantidade relativa de açúcares presentes na região central madura (MP) da variedade IACSP04-627.