

JULLYANA CRISTINA MAGALHÃES SILVA MOURA SOBCZAK

**“LIGNIFICAÇÃO EM EUCALIPTOS SUBMETIDOS AOS
ESTRESSES DE FRIO E SECA: ASPECTOS
BIOQUÍMICOS E MOLECULARES”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULLYANA CRISTINA MAGALHÃES SILVA MOURA SOBCZAK

**“LIGNIFICAÇÃO EM EUCALIPTOS SUBMETIDOS AOS
ESTRESSES DE FRIO E SECA: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Jullyana Cristina M.S.M. Sobczak
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. PAULO MAZZAFERA

CAMPINAS,
2013

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

So12L Sobczak, Jullyana Cristina Magalhães Silva Moura, 1984-
Lignificação em eucaliptos submetidos aos estresses
de frio e seca: aspectos bioquímicos e moleculares /
Jullyana Cristina Magalhães Silva Moura Sobczak. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Eucalipto. 2. Papel. 3. *Lignina*. 4. Frio. 5.
Seca. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Lignification in *Eucalyptus* subjected to cold and drought stresses:
biochemical and molecular aspects

Palavras-chave em Inglês:

Eucalyptus

Paper

Lignin

Cold

Drought

Área de concentração: Fisiologia Vegetal

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Paulo Mazzafera [Orientador]

Halley Caixeta de Oliveira

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Giancarlo Pasquali

Carlos Augusto Colombo

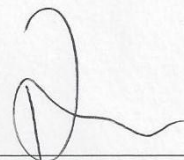
Data da defesa: 30-01-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 30 de janeiro de 2013

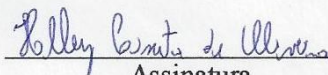
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)



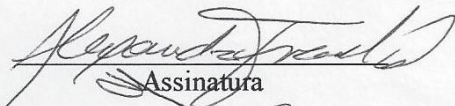
Assinatura

Prof. Dr. Halley Caixeta De Oliveira



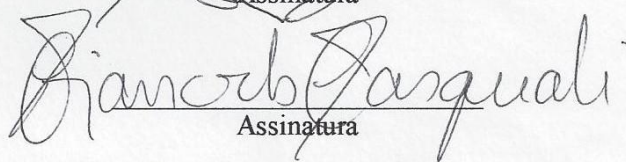
Assinatura

Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya



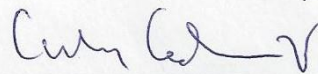
Assinatura

Prof. Dr. Giancarlo Pasquali



Assinatura

Dr. Carlos Augusto Colombo




Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Antunes De Azevedo



Assinatura

Profa. Dra. Adáíses Simone Maciel Da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Jose Salvador



Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico

Às minhas mães

Silvana Cabral Silva Moura (*in memoriam*)

e Alice Cabral Silva

Aos meus pais

Napoleão Magalhães Moura

e Jorge Rosa Silva

Ao meu esposo

Jobert Fernando Sobczak

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“When the composition of the skeleton of plants is known, it will be easy to help the various industries challenged with the production of alcohol or pulp from wood or straw” (Fremy, 1876).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me conduzido até aqui e por estar sempre iluminando o meu caminho e me dando força e saúde para continuar seguindo em frente.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela orientação deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, particularmente ao Instituto de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pela estrutura física para a realização desta pesquisa. À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de doutorado concedida.

Agradeço a Fibria Celulose S.A. pelo suporte financeiro e fornecimento do material vegetal estudado, em especial a Juliana de Oliveira Fernandes Viana e César Augusto Valencise Bonine.

Agradeço ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek pela disponibilização do GC-MS e pela sua boa vontade sempre em ensinar e esclarecer dúvidas quanto ao funcionamento deste equipamento. Agradeço também ao Prof. Dr. Halley Oliveira e a Profa. Dra. Alexandra Sawaya pelo apoio nesta parte das análises.

A todos os amigos e colegas que me acompanharam neste período, em especial àqueles que tanto me ajudaram na bancada do laboratório ou na casa de vegetação, Uiara Romero, Vivian Moura, Kellen Hisatugo, Viviane Santarosa, Laerti Roque, Eduardo Kiyota, Luciano Pereira e Adilson Júnior. Agradeço também Alexandra Bottcher, Adriana Brombini, Pedro Araújo, Paula Nobile, Michael Brito, Adaíses Maciel, Sarah Ribeiro e Caroline Caramano pelas conversas científicas ou do dia-a-dia.

Agradeço à minha mãe Alice Cabral Silva que, embora nunca escondesse seus sentimentos de saudade, sempre me acalmou e me fez sentir mais confiante nos momentos difíceis. À minha mãe Silvana Cabral Silva Moura que possibilitou que tudo isto ocorresse. Ao meu pai Jorge Rosa Silva que, durante todo este tempo, nunca se esqueceu de perguntar se eu estava feliz. À minha grande amiga Luzia Rezende de Oliveira, que sempre foi uma parte muito importante da minha família. Ao Jober Fernando Sobczak, pela compreensão em todos os momentos e pela companhia em muitos dos horários que precisei ir e voltar da UNICAMP.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| DEDICATÓRIA..... | iv |
| EPÍGRAFE..... | v |
| AGRADECIMENTOS..... | vi |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| RESUMO..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Lignina e a Produção do Papel..... | 6 |
| 1.1.1. Processo de Produção..... | 6 |
| 1.1.2. Conteúdo de Lignina..... | 7 |
| 1.1.3. Guaiacil..... | 8 |
| 1.1.4. Siringil..... | 8 |
| 1.1.5. Lignina Klason Solúvel e Insolúvel..... | 9 |
| 1.1.6. Tipos de Ligações..... | 10 |
| 1.1.7. Influência da Massa Molecular da Lignina no Processo de Polpação..... | 11 |
| 1.1.8. Coniferaldeído..... | 11 |
| 1.2. <i>Eucalyptus</i> , Lignina e a Produção de Papel..... | 14 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 15 |
| 3. OBJETIVOS..... | 16 |
| 3.1. Gerais:..... | 16 |
| 3.2. Específicos:..... | 16 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 16 |
| 4.1. Material Vegetal..... | 16 |
| 4.2. Experimentos de Baixa Temperatura..... | 17 |
| 4.3. Experimentos de Estresse Hídrico..... | 19 |
| 4.4. Medidas de Trocas Gasosas e Potencial Hídrico..... | 19 |
| 4.5. Procedimentos de Coleta..... | 20 |
| 4.6. Delineamento Experimental..... | 21 |
| 4.7. Estatística..... | 21 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.8. | Preparo do Material Vegetal para Análises | 22 |
| 4.9. | Dosagem de Lignina pelo Método do Ácido Tioglicólico | 22 |
| 4.10. | Dosagem de Lignina pelo Método Klason | 23 |
| 4.11. | Extração de Ligninas por Tioacidólise | 24 |
| 4.12. | Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS) | 25 |
| 4.13. | Extração de Ligninas e Análise em Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas (LC-MS)..... | 25 |
| 4.14. | Ensaio de Digestibilidade de Celulose | 26 |
| 4.15. | Planejamento de Primers..... | 27 |
| 4.16. | Extração de RNA Total e Síntese de cDNA..... | 31 |
| 4.17. | RT-PCR Quantitativo (RT-qPCR) | 32 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 5.1. | Medidas de Trocas Gasosas e Potencial Hídrico | 34 |
| 5.1.1. | Experimentos de Baixa Temperatura..... | 34 |
| 5.1.2. | Experimentos de Estresse Hídrico | 41 |
| 5.2. | Análises de Lignina e Digestibilidade de Celulose..... | 44 |
| 5.2.1. | Dosagem de Ligninas pelo Método do Ácido Tioglicólico..... | 45 |
| 5.2.2. | Método Klason de Dosagem de Ligninas..... | 47 |
| 5.2.3. | GC-MS..... | 54 |
| 5.2.4. | LC-MS | 60 |
| 5.2.5. | Digestibilidade da Celulose..... | 66 |
| 5.2.6. | Análise Integrada dos Resultados Bioquímicos | 70 |
| 5.2.7. | Qual foi o melhor estresse e região caulinar na geração de alterações bioquímicas benéficas do ponto de vista da produção do papel? | 88 |
| 5.3. | Análise da Expressão Gênica..... | 89 |
| 5.3.1. | <i>E. urograndis</i> P42..... | 89 |
| 5.3.2. | <i>E. globulus</i> | 101 |
| 5.3.3. | <i>E. uroglobulus</i> | 109 |
| 5.3.4. | Comparações entre Espécies | 111 |
| 6. | CONCLUSÕES | 114 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Hidroxicinamoil álcoois (1-3) e hidroxicinamaldeídos (4-6)..... | 02 |
| Figura 2. Rota de biossíntese de monolignóis precursores da lignina..... | 04 |
| Figura 3. Principais tipos de ligações formadas entre os monômeros de ligninas..... | 05 |
| Figura 4. (a) Assimilação de CO ₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g _s) em <i>E. urograndis</i> P00 expostos a frio (P00F) ou controle (P00C)..... | 36 |
| Figura 5. (a) Assimilação de CO ₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g _s) em <i>E. urograndis</i> P42 expostos a frio (P42F) ou controle (P42C)..... | 37 |
| Figura 6. (a) Assimilação de CO ₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g _s) em <i>E. urograndis</i> C19 expostos a frio (C19F) ou controle (C19C)..... | 38 |
| Figura 7. (a) Assimilação de CO ₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g _s) em <i>E. globulus</i> (Glob) expostos a frio (GlobF) ou controle (GlobC)..... | 39 |
| Figura 8. (a) Assimilação de CO ₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g _s) em <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) expostos a frio (UglF) ou controle (UglC)..... | 40 |
| Figura 9. (a) Assimilação de CO ₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g _s) em <i>E. urograndis</i> (C19, P00, P42), <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) e <i>E. globulus</i> (Glob) expostos a seca (S), controle (C) ou seca recuperada (SR)..... | 43 |
| Figura 10. Potencial hídrico foliar (ψ_w) em <i>E. urograndis</i> (C19, P00, P42), <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) e <i>E. globulus</i> (Glob) expostos a seca (S), controle (C) ou seca recuperada (SR)..... | 44 |
| Figura 11. Dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico em ápices (a) e bases (b) caulinares de <i>E. urograndis</i> (P00, P42, C19), <i>E. globulus</i> (Glob) e <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em plantas controle (C)..... | 46 |
| Figura 12. Dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico em ápices (a) e bases (b) caulinares de <i>E. urograndis</i> (P00, P42, C19), <i>E. globulus</i> (Glob) e <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR), ou em plantas controle (C)..... | 47 |
| Figura 13. Dosagem de lignina pelo método Klason em ápices caulinares (a-c) de <i>E. urograndis</i> (P00, P42, C19), <i>E. globulus</i> (Glob) e <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C)..... | 50 |
| Figura 14. Dosagem de lignina pelo método Klason em bases caulinares (a-c) de <i>E. urograndis</i> (P00, P42, C19), <i>E. globulus</i> (Glob) e <i>E. uroglobulus</i> (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C)..... | 51 |

Figura 15. Dosagem de lignina pelo método Klason em ápices caulinares (a-c) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR), ou em plantas controle (C)..... 52

Figura 16. Dosagem de lignina pelo método Klason em bases caulinares (a-c) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR), ou em plantas controle (C)..... 53

Figura 17. Rendimento dos monômeros guaiacil (G) e siringil (S) da lignina (a-b, d-e) e proporção S/G (c, f), determinados por tioacidólise seguida de análise em GC-MS em ápices (a-c) e bases caulinares (d-e) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C)..... 56

Figura 18. Rendimento dos monômeros guaiacil (G) e siringil (S) da lignina (a-b, d-e) e proporção S/G (c, f), determinados por tioacidólise seguida de análise em GC-MS em ápices (a-c) e bases caulinares (d-e) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 57

Figura 19. Frequência de ocorrência de determinada estrutura da lignina, identificada por LC-MS, no experimento de frio (a, c, e) e seca (b, d, f) em ápices e bases caulinares de *E. urograndis* P42, *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 61

Figura 20. Digestibilidade da celulose no experimento de frio (a) e seca (b) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 (P42), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 69

Figura 21. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. urograndis* P42, nos ensaios de frio e seca..... 71

Figura 22. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. urograndis* P00, nos ensaios de frio e seca..... 72

Figura 23. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. urograndis* C19, nos ensaios de frio e seca..... 74

Figura 24. Esquema do padrão de respostas encontrado em *E. urograndis* P42 nos ensaios de frio e seca..... 78

Figura 25. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. globulus*, nos ensaios de frio e seca..... 83

Figura 26. Esquema do padrão de respostas encontrado em *E. globulus* nos ensaios de frio e seca..... 84

Figura 27. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. uroglobulus*, nos ensaios de frio e seca..... 87

Figura 28. Esquema do padrão de respostas encontrado em *E. uroglobulus* nos ensaios de frio e seca..... 88

Figura 29. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 90

Figura 30 Expressão gênica (a-e) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 91

Figura 31. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 92

Figura 32. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 93

Figura 33. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 94

Figura 34. Esquema dos resultados de expressão gênica em *E. urograndis* P42 (P42)..... 95

Figura 35. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 103

Figura 36. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 104

Figura 37. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 105

Figura 38. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 106

Figura 39. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C)..... 107

Figura 40. Esquema com todos os resultados de expressão gênica em *E. globulus* (Glob)..... 108

Figura 41. Esquema com todos os resultados de expressão gênica em *E. uroglobulus* (Ugl)..... 110

Figura 42. Comparação da expressão gênica entre espécies..... 113

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Idade das plantas, data de realização e duração dos experimentos com baixa temperatura. | 18 |
| Tabela 2. Duração de cada experimento de seca e idade das plantas utilizadas..... | 19 |
| Tabela 3. Primers representativos de genes da biossíntese de lignina, desenhados utilizando-se sequências de <i>E. globulus</i> | 29 |
| Tabela 4. Primers representativos de genes da biossíntese de lignina, desenhados utilizando-se sequências do híbrido denominado <i>E. urograndis</i> | 30 |
| Tabela 5. Primers representativos de genes constitutivos..... | 31 |
| Tabela 6. Combinação dos constitutivos mais estáveis (melhor combinação) dentro de cada experimento de estresse hídrico ou baixa temperatura, para cada espécie, os quais foram utilizados como genes de referência nos cálculos da expressão gênica normalizada..... | 33 |

RESUMO

A lignina é um complexo composto fenólico vegetal cujas propriedades lhe permitem desempenhar suas funções, as quais são, principalmente, suporte mecânico dos tecidos vegetais e condução eficiente de seiva no xilema. Atualmente, a lignina é intensamente estudada, pois sua característica hidrofóbica, altamente resistente à degradação química e enzimática, a torna indesejável durante a produção do papel e biocombustíveis. Assim, diversos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de se entender a biossíntese de lignina, de modo a reduzir o conteúdo ou alterar a reatividade da lignina em plantas utilizadas nestes processos.

Pelo presente trabalho foi estudada a lignificação em espécies de eucaliptos utilizados para a produção de papel, utilizando-se tratamentos de baixa temperatura e estresse hídrico como moduladores da lignificação. Foram feitas análises bioquímicas da lignina e estudos da expressão de genes de sua rota biossintética, em duas regiões distintas do caule (ápice e base caulinar), em plantas submetidas aos estresses e em plantas controle. Feito isto, buscou-se relacionar a expressão dos genes analisados com as alterações bioquímicas observadas, com ênfase nas alterações que poderiam ser benéficas do ponto de vista da produção do papel.

Foi observado que em híbridos urograndis P42 (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden), a redução da expressão de *LACA8*, *CAD2* e *4CL0* e o aumento da expressão de *POX8.1* e *CCR1* podem estar relacionados com as respostas bioquímicas benéficas observadas, isto é, aumento de coniferaldeído, lignina solúvel e digestibilidade da celulose.

Em *Eucalyptus globulus* Labill, análises de plantas submetidas à seca indicaram que a redução da expressão de *LACA0* e *CCR1*, e o aumento da expressão de *POX4* e *HCT1*, podem estar relacionados com o aumento da digestibilidade da celulose. Além disso, uma expressão

reduzida de *LACA1*, *LACA6* e *DIR10* podem estar relacionadas com a redução no total de lignina e coniferaldeído. Adicionalmente, em *E. globulus*, a análise de plantas expostas a frio indicou que a redução da expressão do gene *CADI* pode estar relacionada com o aumento da lignina solúvel.

Finalmente, em híbridos uroglobulus (*E. urophylla* S. T. Blake x *E. grandis* Hill ex-Maiden) x (*E. globulus*), comparações das amostras de bases caulinares do ensaio de seca indicaram que a redução da expressão de *DIR10* pode estar relacionada com o aumento da lignina solúvel.

Deste modo, este trabalho pode indicar alguns genes possivelmente relacionados com alterações da lignina que poderiam ser benéficas do ponto de vista da produção do papel e, eventualmente, desejáveis para a produção de biocombustíveis, embora este último caso não fosse o foco do trabalho.

ABSTRACT

Lignin is a complex plant phenolic compound whose properties allow it to perform its functions, which are mainly the mechanical support of plant tissues and efficient xylem sap conduction. Currently, lignin is intensively studied because its hydrophobic feature and high resistance to chemical and enzymatic degradation makes it undesirable for the production of paper and biofuels. Thus, several studies are being conducted with the goal of understanding the biosynthesis of lignin in order to reduce the content or change the reactivity of lignin in plants used in these processes.

In this work, it was studied the lignification in *Eucalyptus* species used for paper production. Low temperature and water stress treatments were used as modulators of lignification. Biochemical analysis of lignin and gene expression studies were performed in two distinct regions of the stem (stem tips and bases) for plants exposed to stress and control plants. After this, the observed biochemical changes (preferentially those which could be beneficial to paper production) were related to results of gene expression.

It was observed that in urograndis P42 hybrids (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden), the reduction of the expression of *LACA8*, *CAD2* and *4CLO* and the increased expression of *POX8.1* and *CCR1* may be related to the beneficial biochemical responses observed, that is, an increased coniferaldehyde, soluble lignin and cellulose digestibility.

In *Eucalyptus globulus* Labill, analysis of plants submitted to drought treatments indicated that a reduced expression of *LACA0* and *CCR1*, and an increased expression of *POX4* and *HCT1*, may be related to increased digestibility of cellulose. Besides that, a reduced expression of *LACA1*, *LACA6* and *DIR10* may be related to the reduction in total lignin and

coniferaldehyde. Additionally, in *E. globulus*, analysis of plants exposed to cold indicated that the reduction of the expression in *CADI* may be related to the increase in soluble lignin.

Finally, in uroglobulus hybrids (*E. urophylla* S. T. Blake x *E. grandis* Hill ex-Maiden) x (*E. globulus*), comparisons of stem bases of plants subjected to drought treatments indicated that reduced expression of *DIR10* may be associated with increased soluble lignin.

In this way, this work indicates some genes possibly related to changes in lignin that could be beneficial for production of paper and possibly be desirable for the production of biofuels, although this latter case was not the focus of the work.

1. INTRODUÇÃO

Lignina é um composto fenólico polimérico, amorfo e tridimensional (Sun *et al.*, 2010), depositado nas paredes celulares de tecidos vegetais envolvidos no suporte mecânico ou na condução de água, principalmente no xilema, mas também no esclerênquima, fibras do floema e periderme (Baucher *et al.*, 1998). Constitui um quarto da biomassa lignocelulósica e é o terceiro biopolímero mais abundante nos organismos vegetais, depois da celulose e hemicelulose (Shi *et al.*, 2012a). Nas plantas, a lignina é importante na condução de seiva no xilema e no suporte mecânico, reforçando as paredes celulares, conferindo rigidez, impermeabilidade à água e também proteção contra patógenos (Pilate *et al.*, 2012). A biossíntese de lignina é estimulada por diversos estresses abióticos e bióticos, podendo ser um importante mecanismo que contribui na resistência a estes processos (para uma revisão ver Moura *et al.*, 2010).

Lignina é formada principalmente por três unidades conhecidas como *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Boerjan *et al.*, 2003; Morreel *et al.*, 2010). Tais unidades são formadas a partir de três hidroxicinamoil álcoois (monolignóis) *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente, (Fig. 1, 1-3) que são fenilpropanoides (C6-C3) que diferem entre si apenas pelo grau de metoxilação (Baucher *et al.*, 1998). Embora estas sejam as estruturas mais comuns, sabe-se que outros monômeros podem estar presentes, tais como o 5-hidroxiguaiacil (derivado do 5-hidroxiconiferil álcool) e unidades derivadas do ácido ferúlico (FA), coniferaldeído (G'), sinapaldeído (S'), e 5-hidroxiconiferaldeído (5H') (Morreel *et al.*, 2010).

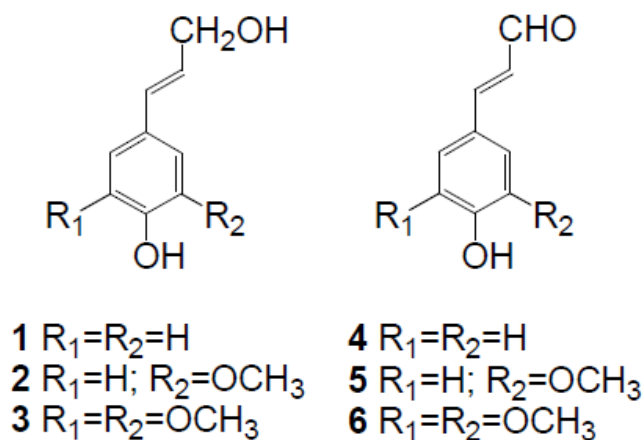


Figura 1. Hidroxicinamoil álcoois (1-3) e hidroxicinamaldeídos (4-6). **1:** *p*-cumarfílico, **2:** coniferílico; **3:** sinapílico; **4:** *p*-cumaraldeído; **5:** coniferaldeído; **6:** sinapaldeído. (Fonte: Gómez-Ros *et al.*, 2007).

A primeira etapa da biossíntese da lignina (Fig. 2) consiste em produzir os precursores monolignóis e inicia-se com a desaminação da fenilalanina para formar o ácido trans-cinâmico, via ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL). O ácido trans-cinâmico é então convertido em ácido *p*-cumárico pela ação de uma citocromo monooxigenase P450, a cinamato-4 hidroxilase (C4H). A partir de então, os ácidos hidroxicinâmicos originados são convertidos em ésteres de coenzima A (CoA) pela ação da hidroxicinamoil CoA-ligase (4CL). Estes ésteres são convertidos até monolignóis por duas etapas sucessivas de redução, a primeira catalizada por hidroxicinamoil-CoA redutase (CCR), formando os hidroxicinamaldeídos, e a segunda etapa via ação da cinamil álcool desidrogenase (CAD), formando os monolignóis (Hano *et al.*, 2006). Também é conhecida a existência de uma álcool sinapílico desidrogenase (SAD) que agiria nesta última etapa de conversão dos cinamaldeídos a cinamoil álcoois, reduzindo preferencialmente sinapaldeído a álcool sinapílico (Li *et al.*, 2001).

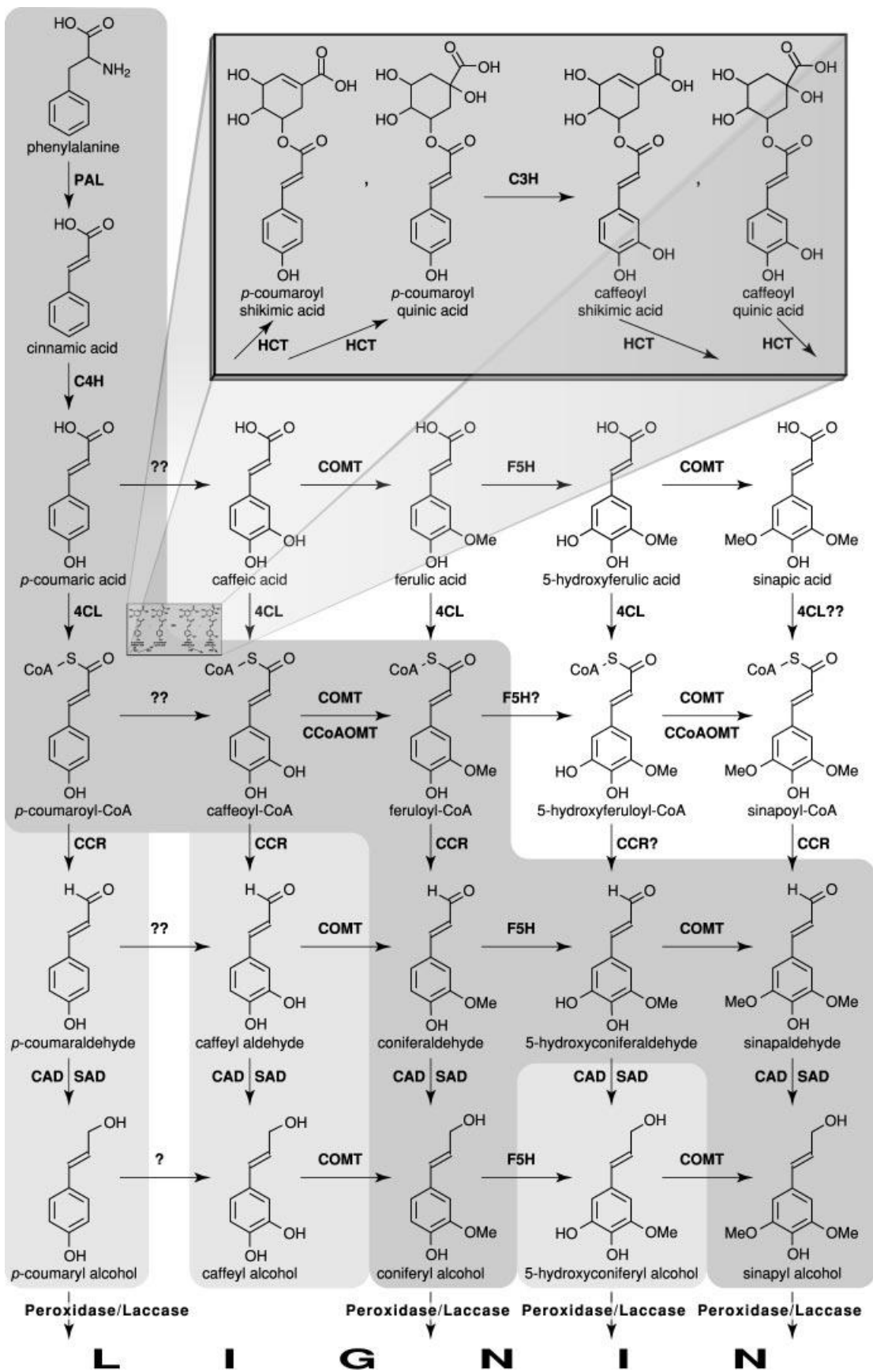




Figura 2. Rota de biossíntese de monolignóis precursores da lignina (Fonte: Boerjan *et al.*, 2003). PAL: Fenilalanina amônia-liase; C4H: Cinamato 4-hidroxilase; 4CL: 4-Hidroxicinamoil CoA ligase; F5H: Ferulato 5-hidroxilase; COMT: Ácido cafeico *O*-metiltransferase; CCR: hidroxicinamoil-CoA redutase; CAD: Cinamil álcool desidrogenase; SAD: álcool sinapílico desidrogenase; CCoAOMT: Cafeoil-CoA *O*-metiltransferase; HCT: Hidroxicinamoil CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase; C3H: *p*-Cumarato 3- hidroxilase.

Os monolignóis sintetizados são transportados até a parede celular, onde são desidrogenados a partir da ação de enzimas tais como peroxidases e lacases (Boerjan *et al.*, 2003; Pilate *et al.*, 2012). Por muito tempo pensou-se que após a desidrogenação destes radicais, os mesmos seriam polimerizados sob controle estritamente químico, dito “aleatório”. Nos últimos anos, porém, demonstrou-se que esta polimerização pode ser comandada por proteínas dirigentes (Davin & Lewis, 2000; Davin & Lewis, 2005). Embora o papel das proteínas dirigentes no processo de polimerização tenha sido duramente criticado por alguns autores que defendem que o processo de polimerização da lignina é controlado apenas quimicamente, sem controle biológico (Ralph *et al.*, 2004), trabalhos recentes apresentam evidências da participação de proteínas dirigentes na lignificação (Wu *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2012b).

As unidades formadoras da lignina podem ser unidas por 20 tipos de ligações (Sun *et al.*, 2000) que podem ser do tipo éter, envolvendo oxigênio (β -O-4', α -O-4, 4-O-5') ou por meio de ligações condensadas envolvendo C-C (β - β ', β -5', 5-5' e β -1' ; Ver Fig. 3). Além disto, a mesma pode estar ainda associada com hemicelulose através de ligações benzil-éter, benzil-éster e fenil-glicosídeos (Sun *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008).

As unidades constituídas por ligações β -O-4, denominadas β -aril éters, são sub-estruturas bem frequentes na molécula de lignina (Sun *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012), sendo predominantes nas ligninas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., as quais também possuem

grandes quantidades de resinóis (β - β ; Marita *et al.*, 1999). Outras ligações bem comuns nas ligninas constituem as fenilcumaranas (β -5'; Rencoret *et al.*, 2009).

A quantidade e a composição das ligninas variam entre as diferentes espécies, indivíduos de uma população, tipos celulares e entre as camadas individuais das paredes celulares, sendo influenciadas por fatores ambientais, estágio de desenvolvimento (Campbell & Sederoff, 1996) e por diversos tipos de estresses (Moura *et al.*, 2010). As ligninas de angiospermas dicotiledôneas consistem principalmente de unidades G e S e traços de unidades H. Em pteridófitas e gimnospermas, as ligninas são compostas principalmente de unidades G com níveis baixos de unidades H. Ligninas de angiospermas monocotiledôneas incorporam unidades G e S em níveis equivalentes e mais unidades H do que dicotiledôneas (Baucher *et al.*, 1998).

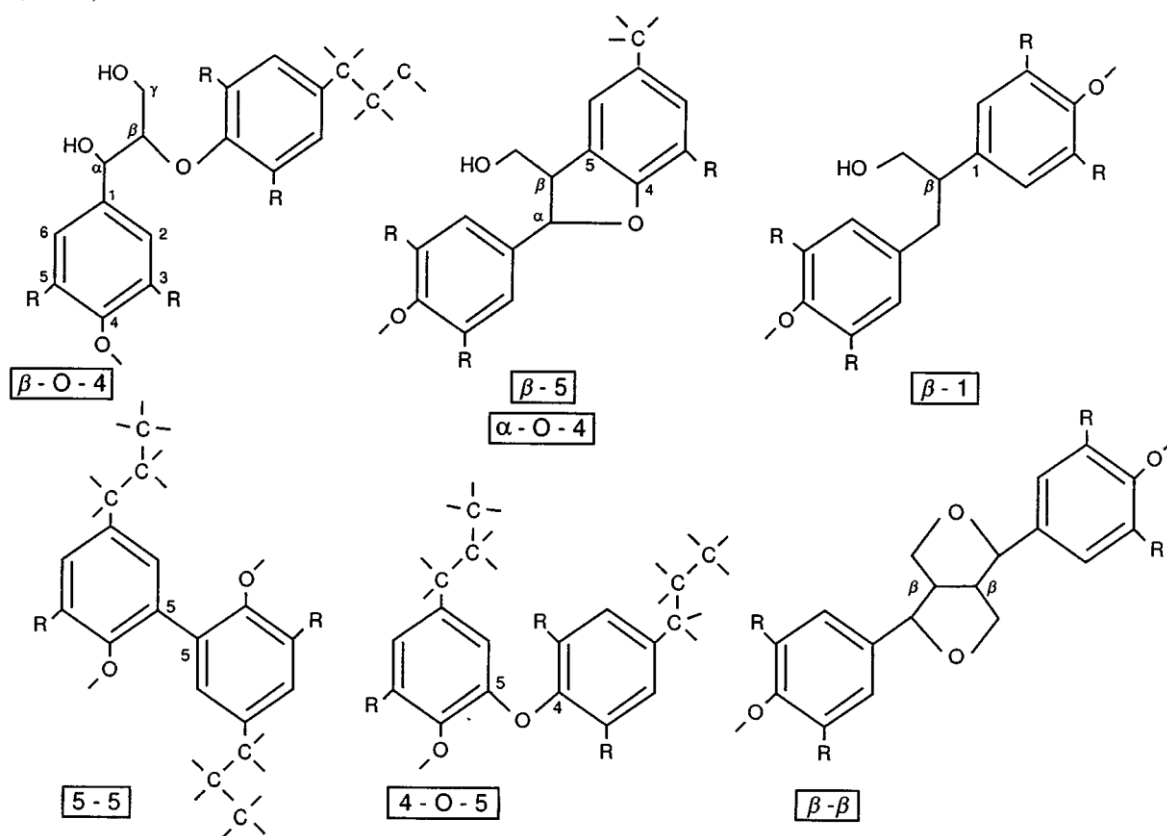


Figura 3. Principais tipos de ligações formadas entre os monômeros de ligninas (Baucher *et al.*, 1998). β -O-4 = β -aril éter; β -5 = fenilcumaranas; 5-5 = bifenil; β - β = resinóis.

Além disso, a abundância relativa de cada tipo de ligação no polímero da lignina irá depender do tipo de monômero que é incorporado durante o processo de síntese. Ligninas compostas principalmente de unidades G, tais como as de coníferas, contêm mais ligações condensadas (β -5, 5-5 e 4-O-5') do que aquelas de plantas que incorporam unidades S, sendo que isto ocorre devido à disponibilidade de ocorrência de ligação no C5 da unidade G, que é inexistente na unidade S (Boerjan *et al.*, 2003).

1.1.Lignina e a Produção do Papel

1.1.1. Processo de Produção

Para a produção de papel de alta qualidade, é realizada a polpação química, que consiste na hidrólise e na solubilização das ligninas com uso de temperaturas altas e pH básico (Baucher *et al.*, 1998). O processo de polpação química mais utilizado é o Kraft, no qual os cavacos da madeira são tratados com altas temperaturas (150-170°C), hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, sendo grande parte das ligninas hidrolisadas e solubilizadas neste processo (Lisboa *et al.*, 2005). Este tipo de polpação tem potencial de liberação de vários gases tóxicos na atmosfera, tais como mercaptanas (Viikari *et al.*, 1994 citados por Baucher *et al.*, 1998). Este potencial é controlado pelas empresas produtoras pelo uso de filtros que evitam a poluição do ar, o que onera ainda mais o processo de fabricação da pasta de celulose e papel. Atualmente, vêm sendo estudadas alterações neste método, que possibilitem maior eficiência do processo (Akgül *et al.*, 2007), bem como formas alternativas de polpação (Khristova *et al.*, 2006a; Huang *et al.*, 2007).

O processo de polpação química por si só não é suficiente para a remoção completa das ligninas. Assim, a polpa deve passar por uma etapa de branqueamento para remover ligninas residuais ainda presentes. Os agentes alvejantes, tais como o cloro, o hipoclorito e o dióxido

de cloro, são muito eficientes na redução dos resíduos de ligninas. No entanto, devido ao fato de liberarem uma grande quantidade de efluentes tóxicos com elevada carga de compostos organoclorados, o que novamente exige das fábricas onerosas ações antipoluentes, estes agentes vêm sendo substituídos por compostos ecologicamente mais aceitáveis (Nascimento & Morais, 1998). Peróxido, oxigênio, ozônio e enzimas são alguns dos reagentes que podem ser utilizados no novo método de branqueamento, denominado “totalmente sem cloro” (TCF) (Ibarra *et al.*, 2005). Além disto, fungos e bactérias também vêm sendo estudados como candidatos a serem utilizados neste processo (Agosin *et al.*, 1990; Guerra *et al.*, 2004; Kachlishvili *et al.*, 2005; Raj *et al.*, 2007).

1.1.2. Conteúdo de Lignina

Tanto a quantidade quanto a composição da lignina e ligações presentes, podem interferir no processo de aproveitamento da celulose para a produção de papel, afetando as taxas de deslignificação, consumo de químicos e rendimento da polpa (Higuchi *et al.*, 1994; Rencoret *et al.*, 2009). Assim, uma diminuição do conteúdo de lignina e alterações que conduzam a estruturas químicas mais suscetíveis durante a polpação são características visadas em programas de melhoramento genético e biotecnologia (Higuchi *et al.*, 1994).

O conteúdo de lignina apresentou-se negativamente correlacionado com o rendimento da polpa celulósica em *Eucalyptus globulus* Labill [plantas de 5-7 anos de idade oriundas de um campo experimental no sul do Chile (37°21’S;73°29’W)], ao passo que o conteúdo de S e a quantidade de ligações β -O-4 foram positivamente correlacionados com o rendimento da polpa (Elissetche *et al.*, 2011). Entretanto, em *E. globulus* (plantas de 8-11 anos de idade), o conteúdo de lignina não esteve correlacionado com o rendimento da polpa, mas a proporção S/G esteve positivamente relacionada, indicando que a composição da lignina pode ser um

parâmetro mais importante influenciando o rendimento da polpa do que a quantidade de lignina (Del Río *et al.*, 2005). Entretanto, já foi observado em *E. globulus* que tanto o conteúdo de lignina quanto a proporção S/G podem não se correlacionar com o rendimento da polpa (Guerra & Elissetche, 2008), mas o conteúdo de lignina parece estar menos relacionado (Pinto *et al.*, 2005; Rio *et al.*, 2005; Lourenço *et al.*, 2008).

1.1.3. Guaiacil

De um modo geral, há um senso comum de que uma menor proporção de unidades G na composição das ligninas resulta em menos energia e produtos químicos durante a polpação alcalina e subsequente branqueamento durante a produção do papel (Rencoret *et al.*, 2009). Isto é devido ao fato de a unidade G ter uma posição livre no carbono 5 do anel aromático, ficando disponível para ligações intermonoméricas carbono-carbono, que são altamente resistentes aos processos de despolimerização da lignina durante a polpação (Del Río *et al.*, 2009; Rencoret *et al.*, 2009). As ligações C-C formadas não se quebram em diversas condições alcalinas devido à sua grande estabilidade (Sun *et al.*, 2010). Deste modo, diz-se que as unidades G são pouco reativas no processo de polpação (Rencoret *et al.*, 2009).

1.1.4. Siringil

Uma das estratégias mais desejáveis do melhoramento genético de espécies arbóreas destinadas à produção de celulose e papel é produzir madeiras contendo ligninas mais ricas em S, esperando-se que este tipo de lignina possa melhorar processos industriais/características agronômicas, e permanecer funcional na planta (Marita *et al.*, 1999). Unidades S têm menos posições disponíveis para ligação e menos ramificações, estando conseqüentemente envolvidas em menos estruturas (Marita *et al.*, 1999). Ao contrário de G, S é incapaz de formar ligações no carbono 5, pois ambas as suas posições C-3 e C-5 estão metoxiladas

(Toledano *et al.*, 2010), o que aumenta a propensão de ligações acontecerem envolvendo o oxigênio fenólico, formando β -aril éter estruturais (Kishimoto *et al.*, 2010). Ligninas enriquecidas com S apresentam mais ligações β -O-4 e β - β , em detrimento de fenilcumaranas (β -5) e bifenil (5-5) (Marita *et al.*, 1999; Kishimoto *et al.*, 2010).

Ligninas ricas em S são mais facilmente degradadas e extraídas (Marita *et al.*, 1999) e, em geral, a eficiência da polpação é diretamente proporcional à quantidade de unidades S (Del Río *et al.*, 2009). Altas proporções de unidades S permitem a remoção mais fácil da lignina durante a polpação Kraft, resultando em menos consumo de álcalis, menos degradação da celulose e, conseqüentemente, rendimentos de polpa mais altos (Del Río *et al.*, 2005). Além disto, a extensão da recondensação da lignina durante a polpação alcalina é dificultada nas unidades S pela presença dos grupos metoxil adicionais (Guerra e Elissetche, 2008).

Em *E. globulus*, foi observada correlação positiva entre a quantidade de S e o rendimento da polpa (Elissetche *et al.*, 2011). Além disto, em *Populus tremula* x *Populus alba*, o aumento do conteúdo de unidades S, proporcionado pela superexpressão de gene codificador da ferulato 5- hidroxilase (F5H), resultou em um significativo aumento da eficiência na polpação e no branqueamento, sem alteração na quantidade de lignina (Huntley *et al.*, 2003).

1.1.5. Lignina Klason Solúvel e Insolúvel

Yasuda *et al.* (2001) observaram que 58% da lignina solúvel em 72% de ácido sulfúrico é constituída de ligninas ricas em unidades S e apenas 19% deste tipo de lignina está presente na fração insolúvel. De acordo com estes autores, isto se justifica pelo fato dos núcleos S serem mais reativos ao ácido sulfúrico do que os grupos G. Observaram, também, que amostras de madeira de pinheiro, gimnosperma que possui principalmente ligninas do tipo

G, apresentam valores muito baixos de ligninas solúveis. Kishimoto *et al.* (2010), observaram redução da quantidade de lignina insolúvel Klason com o aumento da proporção S/G, além de uma tendência de que o aumento da proporção S/G seja acompanhado de aumento da lignina solúvel. Deste modo, a quantidade de lignina Klason solúvel pode ser um indicativo do aumento da quantidade de unidades S, tendo em vista que esta unidade geralmente é o principal componente destas frações (Yasuda *et al.*, 2001). Por este motivo, o aumento da quantidade de lignina solúvel pode ser considerado como um aspecto positivo do ponto de vista da produção do papel, ao contrário da lignina insolúvel, a qual pode ser mais enriquecida com unidades G.

1.1.6. Tipos de Ligações

Estudos sobre os mecanismos que governam a despolimerização da lignina durante a polpação Kraft demonstraram que as ligações éter, tais como α e β aril, são as primeiras a serem quebradas, enquanto as ligações resistentes C-C acumulam na lignina residual. Deste modo, a frequência relativa de unidades ligadas por β -aril dentro da macromolécula da lignina é uma característica estrutural importante que influencia a despolimerização e a consequente solubilização da lignina no liquor em cozimento (Guerra e Elissetche, 2008).

As ligações β -O-4 são clivadas em maior extensão durante o cozimento alcalino enquanto as ligações condensadas resistem (Ibarra *et al.*, 2007), sendo também mais suscetíveis à hidrólise durante o pretratamento “etanol organosolv” (EOP; Hallac *et al.*, 2010). Elissetche *et al.* (2011) observaram correlação positiva entre a quantidade de ligações β -O-4 e o rendimento da polpa em *E. globulus*.

Assim, a alta predominância de ligninas enriquecidas com unidades S, juntamente com uma maior predominância de ligações aril éter β -O-4', poderiam ser características vantajosas

para a produção do papel e, portanto, desejáveis quando se busca modificar as ligninas em plantas para este fim.

1.1.7. Influência da Massa Molecular da Lignina no Processo de Polpação

Ligninas compostas em grande parte por unidades G provavelmente terão uma massa molecular mais alta do que aquelas com alto conteúdo de S (Tejado *et al.*, 2007). É difícil produzir ligninas com alta massa molecular utilizando-se apenas álcool sinapílico *in vitro* e, possivelmente, isto também seja verdadeiro *in planta* (Marita *et al.*, 1999). Assim, ligninas mais ricas em S possuem menor massa molecular. Frações de lignina de menor massa molecular contêm menos grupos condensados e são menos termoestáveis (Sun *et al.*, 2010) o que poderia ser útil no processo de extração de ligninas durante a polpação.

1.1.8. Coniferaldeído

O coniferaldeído (ver Fig. 1) é um hidroxicinamaldeído reduzido pela enzima CAD em seu respectivo álcool coniferílico (Möller *et al.*, 2005). Também é um dos principais substratos da F5H, também denominada de coniferaldeído 5-hidroxilase (CAld5H; Marita *et al.*, 1999).

Gómez-Ros *et al.* (2007) demonstraram que a incorporação de hidroxicinamaldeídos na lignina foi um evento precoce durante a evolução das plantas terrestres. Estes autores observaram a presença de coniferaldeído e sinapaldeído em todas as espécies estudadas de angiospermas e também no licopódio *Sellaginella martensii*. Em samambaias e nas gimnospermas, apenas coniferaldeído foi encontrado (com exceção da gimnosperma *Ephedra viridis*, Gnetales, na qual foi encontrado também o sinapaldeído). Além disto, o conteúdo de coniferaldeído pode ser aumentado em plantas transgênicas com redução da expressão de CAD (Higuchi *et al.*, 1994; Yahiaoui *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 2001) e de ácido cafeico *O*-metiltransferase (COMT; Tsai *et al.*, 1998).

Os hidroxicinamaldeídos (coniferaldeído e sinapaldeído; Fig. 1) são incorporados nos polímeros de ligninas em crescimento, onde são copolimerizados com os álcoois coniferílico e sinapílico para render polímeros de ligninas heterogêneos constituídos de alcoóis e aldeídos (Gómez-Roz *et al.*, 2007). Embora os trabalhos tenham em comum a demonstração de que o sinapaldeído liga-se tanto a S quanto a G (pela posição β de sua cadeia com a posição O-4 de um G ou S; Ralph *et al.*, 2001; Gómez-Roz *et al.*, 2007), há uma certa divergência com relação à possibilidade de ligação do coniferaldeído ao G. De acordo com Ralph *et al.* (2001) e Gómez-Roz *et al.* (2007), o coniferaldeído pode se ligar somente às unidades S (pela posição β com a posição O-4 de um S). Entretanto, Ito *et al.* (2002) demonstraram a possibilidade de dimerização do coniferaldeído com o álcool coniferílico utilizando *horseradish* peroxidase/peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Adicionalmente, Ito *et al.* (2002) observaram que os principais tipos de ligações presentes nos dímeros formados por coniferaldeído e álcool coniferílico eram ligações β -O-4, mas também observaram β -5 (fenilcumaranas).

A polimerização da lignina em um sistema modelo de parede primária de milho não lignificada, utilizando-se coniferaldeído, álcool coniferílico, peroxidase e H_2O_2 exógeno, demonstrou que ligninas enriquecidas com coniferaldeído podem proporcionar uma maior solubilidade em meio alcalino, facilitando a deslignificação de plantas durante a produção de papel, mas também podem ser inibitórias à degradação da parede celular (hidrólise enzimática), reduzindo a liberação de açúcar (Grabber *et al.*, 1998). Esta maior extratibilidade das ligninas enriquecidas com coniferaldeído é devido ao fato de que o mesmo não é propenso a formar ligações com outros constituintes da parede celular (proteínas, e polissacarídeos estruturais) via intermediários de quinona metídeos formados durante o acoplamento β -O-4 dos monolignóis (Grabber *et al.*, 1998). Entretanto, deve-se ter cuidado na extrapolação deste

modelo *in vitro* para a parede celular primária, pois pode haver diferenças na composição da lignina e na degradabilidade das paredes celulares secundárias. (Grabber *et al.*, 1998).

A supressão da expressão de *COMT* em *Populus tremuloides* Michx não causou alteração no conteúdo de lignina, mas resultou em aumento de coniferaldeído e redução da proporção S/G (aumento de G e redução de S; Tsai *et al.*, 1998). O aumento do coniferaldeído nas ligninas destas plantas transgênicas poderia ser o resultado de uma mudança na rota de biossíntese dos precursores da lignina favorecendo a síntese de G (Tsai *et al.*, 1998).

A supressão da expressão (do gene codificador) de *CAD* em tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) não causou alteração do conteúdo de lignina, mas causou aumento de coniferaldeído e melhorou a extratibilidade das ligninas em meios alcalinos. Além disto, foi observada redução do rendimento de ligações β -O-4 liberadas por tioacidólise (S + G), redução da proporção S/G devido, principalmente, à drástica redução de S (Yahiaoui *et al.*, 1998). O baixo rendimento da tioacidólise pode ser um indicativo de alto conteúdo de ligações C-C (condensadas). Entretanto, o mais provável é que a redução do rendimento de G e S em β -O-4 tenha ocorrido devido ao aumento dos cinamaldeídos (incluindo o coniferaldeído) na lignina (Yahiaoui *et al.*, 1998).

Ito *et al.* (2002) caracterizaram e quantificaram dímeros obtidos pelo tratamento com *horseradish* peroxidase/H₂O₂ em misturas de reação de coniferaldeído e álcool coniferílico, e observaram que os dímeros de álcool coniferílico encontravam-se ligados por β -O-4, β -5 ou β - β , sendo que β -5 foi caracterizada como a ligação mais frequente, seguido de β -O-4 e β - β . Entretanto, a incorporação de coniferaldeído no processo aumenta a ocorrência de ligações β -O-4 e, conseqüentemente, altera a ocorrência das demais ligações condensadas, tais como β -5. Assim, nos dímeros formados pela ligação de álcool coniferílico e coniferaldeído, as ligações

encontradas foram β -O-4 e β -5, sendo que o tipo de ligação mais frequente foi o β -O-4, seguido de β -5. Os resultados de Ito *et al.* (2002) também indicaram que a reatividade do álcool coniferílico é maior do que a do coniferaldeído durante a polimerização desidrogenativa da peroxidase, o que faz com que os dímeros de álcool coniferílico tenham a propriedade de serem formados em maior quantidade e em maior velocidade, sobrando mais substrato coniferaldeído do que álcool coniferílico.

Esses dados da literatura ajudam a entender que, mesmo em casos onde ocorre redução de álcool siringílico em β -O-4, é possível aumentar a solubilidade e extratibilidade das ligninas durante a polpação Kraft a partir da maior incorporação do coniferaldeído na lignina. Entretanto, deve-se ficar atento com as possíveis diferenças que podem ser observadas entre experimentos distintos com graus de redução ou aumento de coniferaldeído diferentes, bem como entre espécies diferentes, pois o efeito do coniferaldeído nas propriedades da lignina pode ser divergente e contexto-dependente das outras alterações também observadas. A redução de 90% da atividade de COMT em *P. tremula* x *P. alba* resulta em aumento de coniferaldeído e em redução de S ligado em β -O-4, tal como foi observado na supressão de CAD por Yahiaoui *et al.* (1998). Entretanto, foram observados também aspectos novos, tais como o aumento de G e de álcool 5-OH-guaiacílico ligados em β -O-4, e as ligninas ficaram mais resistentes à deslignificação Kraft (Lapierre *et al.*, 1999).

1.2. *Eucalyptus*, Lignina e a Produção de Papel

Eucalyptus (L' Herit) é o gênero arbóreo mais amplamente utilizado na indústria do papel em regiões tropicais, subtropicais e em algumas regiões temperadas (Khristova *et al.*, 2006b), sendo um dos gêneros de crescimento rápido mais promissores para fins de fabricação

de papel (Xie, 2004). Contudo, há diferenças significativas nas características de polpação entre as mais de 500 espécies encontradas neste gênero (Xie, 2004).

Em *E. globulus*, por exemplo, foi observada uma vasta gama de variação de rendimento da polpa celulósica (40-60%) após a polpação pelo método Kraft (Del Río *et al.*, 2005). De acordo com Dutt e Tyagi (2011), diferenças na eficiência de polpação em espécies de *Eucalyptus* crescendo em condições topológicas diferentes podem ser atribuídas às variações nas condições do solo e disponibilidade de água. Entretanto, variações significativas do rendimento de polpa foram observadas em clones de *E. globulus* pertencentes a uma mesma área geográfica (Guerra e Elissetche, 2008). Deste modo, em uma mesma espécie e em condições ambientais similares, podem ser observadas diferenças significativas do rendimento da polpa. Tais diferenças no rendimento podem estar relacionadas com a quantidade e composição das ligninas. Por exemplo, ligninas de *E. globulus* possuem mais unidades S, maior proporção S/G e menos estruturas condensadas do que em *Eucalyptus viminalis* Labill., o qual tem mais estruturas fenilcumaranas (β -5), bifenil (5-5') e β -6, e é mais resistente à deslignificação e apresenta menor rendimento (Xie, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Devido à grande importância do *Eucalyptus* para a produção do papel, e tendo em vista a potencial diversidade das ligninas que podem ser encontradas, as quais podem apresentar características indesejáveis durante a polpação Kraft, julga-se importante conhecer o conteúdo e a estrutura das ligninas, bem como os mecanismos moleculares regulatórios da lignificação nas espécies deste gênero. Conhecendo-se isto, características bioquímicas benéficas, juntamente com os padrões de expressão gênica, poderiam indicar os genes relacionados, os quais, por sua vez, poderiam ser utilizados como alvos em programas de melhoramento

genético clássico e biotecnologia que visam obter plantas melhoradas para este aspecto industrial.

Sabe-se que alguns estresses abióticos podem interferir no processo de lignificação em várias espécies (para uma revisão ver Moura *et al.*, 2010). Deste modo, alguns destes estresses, tais como o frio e a seca, poderiam ser utilizados como moduladores da biossíntese de lignina, auxiliando neste processo de compreensão do controle molecular das características bioquímicas da lignina (conteúdo, composição monomérica, tipos de ligações). Além disto, sabendo-se que diferentes tecidos de uma mesma planta podem apresentar, naturalmente, diferenças no conteúdo ou composição das ligninas (Önnerud e Gellerstedt, 2003), estas diferenças também poderiam ser estudadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais:

Estudar os aspectos bioquímicos e moleculares da lignificação em espécies de eucaliptos utilizados para a produção de papel, utilizando-se tratamentos de baixa temperatura e estresse hídrico como moduladores da lignificação.

3.2. Específicos:

Analisar a expressão de genes codificadores de enzimas envolvidas na síntese de lignina e relacionar as suas expressões com as alterações bioquímicas observadas, com ênfase nas alterações que poderiam ser benéficas do ponto de vista da produção do papel.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Foram realizados experimentos com baixa temperatura, e com estresse hídrico, com híbridos uroglobulus RS01HG (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden) x (*E. globulus* Labill.), aqui simplifcadamente denominados de *E. uroglobulus*. Também foram utilizados *E. globulus* Labill e três clones de híbridos urograndis (*E. urophylla* S. T. Blake x *E. grandis* Hill ex-Maiden) C219, P002H, P4295H, aqui denominados, respectivamente, de *E. urograndis* C19, P00 e P42. Os eucaliptos estudados foram fornecidos pela empresa Fibria Celulose S.A. e, após o recebimento destas mudas, as mesmas foram mantidas em estufa na temperatura ambiente até o momento da realização dos ensaios com baixa temperatura e seca. As plantas destinadas aos experimentos de estresse hídrico foram transplantadas em vasos de 4L, em mistura de solo e areia (2:1, v/v), plantando-se de 3-4 plantas por vaso. As plantas do ensaio de baixa temperatura foram transplantadas para vasos de 1L, em substrato de solo.

4.2. Experimentos de Baixa Temperatura

Durante o dia, todas as plantas foram mantidas em estufa de casa de vegetação na temperatura ambiente, a qual foi aferida durante o decorrer dos experimentos (tabela 1). Ao escurecer, algumas plantas foram colocadas em câmaras frias e no escuro. Ao mesmo tempo, as plantas controle foram transferidas para câmaras escuras na temperatura ambiente. Todas as plantas, tratadas ou controle tiveram um fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro. Os valores médios de temperatura mínima e máxima, na câmara fria, foram, respectivamente, 3,2 e 5,7°C para *E. urograndis*, 6,1 e 9,1°C para *E. globulus* e 5,7 e 8,8°C para *E. uroglobulus*. Os valores diários de temperatura na câmara fria e na câmara controle de todos os ensaios de frio encontram-se na tabela 1. Os experimentos de frio tiveram a duração de 7, 8 e 10 dias. A duração de cada experimento e a idade das plantas utilizadas também podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1. Idade das plantas, data de realização e duração dos experimentos com baixa temperatura. Dias destacados de cinza correspondem às datas de medições de fotossíntese. As temperaturas estão indicadas por mínima e máxima observadas (separadas por barras). Temperatura Dia (°C) corresponde à temperatura comum na qual todas as plantas foram mantidas durante o dia. Em Câmara Controle Escura (°C) e Câmara Fria Escura (°C) estão indicadas as temperaturas noturnas nas quais as plantas controle e sob estresse, respectivamente, foram mantidas.

| Espécie | Idade (Dias) | Ano | Mês | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | Dia 5 | Dia 6 | Dia 7 | | | |
|-----------------------------|---------------------|------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| <i>E. urograndis</i> C219 | 99 | 2009 | Setembro/Outubro | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 1 | 2 | | | |
| <i>E. urograndis</i> P002H | 99 | 2009 | Setembro/Outubro | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 1 | 2 | | | |
| <i>E. urograndis</i> P4295H | 99 | 2009 | Setembro/Outubro | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 1 | 2 | | | |
| Temperatura Dia (°C) | | | | 28°/30° | 26°/36° | 23°/33° | 21°/23° | 16°/22° | 22°/30° | coletado | | | |
| Câmara Controle Escura (°C) | | | | 23°/23° | 23°/24° | 23°/24° | 22°/24° | 21°/23° | 22°/22° | | | | |
| Câmara Fria Escura (°C) | | | | 3°/5° | 4°/5° | 3°/6° | 3°/6° | 3°/6° | 3°/6° | | | | |
| Espécie | Idade (Dias) | Ano | Mês | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | Dia 5 | Dia 6 | Dia 7 | Dia 8 | | |
| <i>E. globulus</i> | 90 | 2010 | Fevereiro/Março | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 1 | 2 | | |
| Temperatura Dia (°C) | | | | 27°/33° | 26°/36° | 21°/25° | 22°/30° | 23°/31° | 19°/31° | 23°/30° | coletado | | |
| Câmara Controle Escura (°C) | | | | 25°/26° | 25°/27° | 25°/26° | 24°/25° | 24°/25° | 23°/25° | 22°/24° | | | |
| Câmara Fria Escura (°C) | | | | 9°/9° | 9°/13° | 6°/10° | 5°/9° | 6°/8° | 4°/8° | 4°/7° | | | |
| Espécie | Idade (Dias) | Ano | Mês | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | Dia 5 | Dia 6 | Dia 7 | Dia 8 | Dia 9 | Dia 10 |
| <i>E. uroglobulus</i> | 90 | 2010 | Abril | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| Temperatura Dia (°C) | | | | 22°/30° | 22°/30° | 22°/30° | 22°/30° | 22°/30° | 22°/31° | 24°/30° | 25°/30° | 25°/30° | coletado |
| Câmara Controle Escura (°C) | | | | 20°/20° | 20°/20° | 20°/20° | 20°/20° | 20°/21° | 20°/21° | 20°/21° | 21°/23° | 23°/24° | |
| Câmara Fria Escura (°C) | | | | 5°/7° | 5°/7° | 5°/7° | 5°/7° | 5°/7° | 5°/15° | 13°/15° | 4°/7° | 4°/7° | |

4.3. Experimentos de Estresse Hídrico

Para estes ensaios, as plantas permaneceram na estufa na temperatura ambiente e foram divididas em três grupos (controle, seca e seca recuperada). As plantas controle foram irrigadas diariamente. As plantas de seca não receberam irrigação e foram coletadas assim que apresentavam sintomas de murcha ao meio dia (12:00h) e permaneciam murchas na manhã do dia seguinte, ou seja, quando apresentavam o que denominamos de “murcha confirmada”. Plantas do grupo seca recuperada eram algumas plantas do grupo de seca que foram irrigadas à tarde, após verificado o sintoma de murcha confirmada, sendo coletadas após a recuperação, o que ocorreu no dia seguinte (cerca de 16 horas após a rega).

Os experimentos de seca tiveram duração variada, conforme a resposta de cada planta, já que o determinante para a coleta ou rega (experimento de seca recuperada) era o sintoma individual de “murcha confirmada”. A duração de cada experimento de seca, bem como informações sobre a idade das plantas utilizadas, estão na tabela 2.

Tabela 2. Duração de cada experimento de seca e idade das plantas utilizadas.

| Espécie | Idade (dias) | Início | Término | Total de Dias |
|-----------------------------|---------------------|---------------|----------------|----------------------|
| <i>E. urograndis</i> C219 | 120 | 24/11/2009 | 14/12/2009 | 21 |
| <i>E. urograndis</i> P002H | 120 | 24/11/2009 | 14/12/2009 | 21 |
| <i>E. urograndis</i> P4295H | 120 | 24/11/2009 | 14/12/2009 | 21 |
| <i>E. uroglobulus</i> | 120 | 26/04/2010 | 08/05/2010 | 13 |
| <i>E. globulus</i> | 120 | 08/06/2010 | 26/06/2010 | 19 |

4.4. Medidas de Trocas Gasosas e Potencial Hídrico

Durante o decorrer dos experimentos de baixa temperatura e seca foram avaliadas a assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), utilizando um analisador de gases por infravermelho IRGA-LCpro+

Photosynthesis System (ADC Bioscientific Ltd.), acoplado com luz artificial simulando radiação de $1050 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. O balanço mínimo para cada medida foi de 2 min. A concentração de CO_2 e a temperatura das folhas foram similares ao do ambiente. Nos experimentos de baixa temperatura, estas medidas foram realizadas ao longo dos experimentos (Tabela 1) e no horário das 11 às 13:00 horas, utilizando-se sempre as mesmas plantas representativas da condição controle e sob estresse de frio. No experimento de estresse hídrico, estas medidas foram realizadas em plantas controle e em plantas do grupo seca ou seca recuperada. Todas as medidas foram realizadas em folhas desenvolvidas, no 3° ou 4° par foliar, preferencialmente no 4° par, uma vez que o mesmo representava a folha mais desenvolvida.

As medidas de potencial hídrico foram conduzidas apenas nos experimentos de seca, utilizando-se uma bomba de Scholander (PMS Instrumentos Co.), obtendo-se medidas dos grupos controle, seca e seca recuperada. As medidas de potencial hídrico foram realizadas com o ápice da planta obtido cortando-se o caule em seguida ao 4° par foliar.

4.5. Procedimentos de Coleta

Ao término dos experimentos de frio e seca, as plantas foram coletadas descartando-se as folhas e coletando-se os primeiros 5cm do caule a partir do ápice. Os próximos 10cm foram descartados e coletou-se os 5cm seguintes. Estas duas porções de 5 cm foram chamadas de ápice e base, respectivamente, correspondendo a uma região pouco lignificada e outra bem lignificada.

Os fragmentos dessas duas regiões do caule foram colocados em sacos de papel alumínio perfurados e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido, sendo

posteriormente armazenados em biofreezer (-80°C), onde permaneceram até o momento das análises.

4.6. Delineamento Experimental

Nos experimentos de baixa temperatura e de seca, foram utilizadas 48 plantas de cada espécie, por tratamento, sendo 15 destinadas para extrações de ácido ribonucléico (RNA; 3 repetições, compostas por 5 plantas cada), 9 plantas para análise pelo método do ácido tioglicólico (3 repetições, compostas por 3 plantas cada), 9 plantas para cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS; 3 repetições, compostas por 3 plantas cada), e 15 plantas destinadas para análises Klason, digestibilidade de celulose e espectrometria de massas (3 repetições, compostas por 5 plantas cada). As medições de trocas gasosas e potencial hídrico foram realizadas em cinco plantas de cada tratamento.

4.7. Estatística

Os tratamentos foram analisados por ANOVA e comparações entre o tratamento e seu respectivo controle foram realizadas pelo teste-*t* de Student com 5% de significância. Os resultados de cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS) foram analisados observando-se a presença ou ausência de determinadas estruturas na lignina. Foi calculada a frequência de ocorrência de cada estrutura em determinado tratamento, dividindo-se o número de amostras que apresentavam a estrutura pelo número total de amostras analisadas do respectivo tratamento. Nos gráficos estas frequências de ocorrência foram apresentadas em porcentagem.

4.8. Preparo do Material Vegetal para Análises

Para a realização das análises bioquímicas, o material vegetal coletado (ápices e bases caulinares) foi previamente triturado com N₂ líquido e liofilizado. O material para a dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico, tioacidólise e digestibilidade de celulose foi adicionalmente lavado com etanol para remover compostos não covalentemente ligados (Day *et al.*, 2005). Para isto, aproximadamente 100 mg das amostras liofilizadas foram lavadas três vezes com 1,5 mL de etanol 80% e uma vez com água deionizada. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min e os precipitados foram deixados secar em estufa a 65°C “overnight”. Para a análise de lignina pelo método Klason, o material triturado e liofilizado foi lavado com acetona em Soxhlet por 8 h, removendo componentes que poderiam formar ‘pseudoligninas’ durante a análise. Após a extração, a acetona foi evaporada em capela sob condições ambiente. Para a análise por LC-MS o material foi apenas triturado em N₂ líquido e liofilizado. Os materiais utilizados para a extração de RNA foram apenas congelados em N₂ líquido e extraídos de acordo com Chang *et al.* (1993), conforme será detalhado posteriormente.

4.9. Dosagem de Lignina pelo Método do Ácido Tioglicólico

O método do ácido tioglicólico envolve a formação de tioéteres do álcool benzílico, grupos tipicamente encontrados na lignina (Hatfield e Fukushima, 2005). Esta análise foi realizada de acordo com Barber e Ride (1988). Para isto, 15 mg de material preparado conforme descrito acima foi tratado com 1 mL de 2N de ácido clorídrico (HCl) e 0,2 mL de ácido tioglicólico. Após homogeneização, a solução foi mantida em banho-maria a 98° C por 4 h e, em seguida, o tubo foi resfriado em gelo e centrifugado a 12.000 rpm por 10 min, descartando-se o sobrenadante. O precipitado (lignina insolúvel em ácido tioglicólico) foi lavado com 1,5 mL de água destilada e centrifugado a 12.000 rpm por 10 min, descartando-se

novamente o sobrenadante. O precipitado foi então solubilizado em 1,5 mL de 0,5N de hidróxido de sódio (NaOH) e deixado “overnight” sob agitação a 150 rpm na temperatura ambiente, para depois ser centrifugado (12.000 rpm por 10 min). O sobrenadante (lignina solubilizada em NaOH) foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 200 µL de HCl concentrado e o tubo levado para um câmara fria, onde permaneceu por 4 h. A adição de HCl permitiu uma nova precipitação da lignina insolúvel em ácido, processo este que foi complementado através da centrifugação (12.000 rpm por 10 min). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e solubilizou-se a lignina precipitada em 2mL de 0,5N NaOH. A lignina extraída pelo método do ácido tioglicólico teve sua absorbância lida em 280 nm e a concentração da lignina foi determinada utilizando-se um padrão *lignin alkali, 2-hydroxypropyl ether* (Sigma-Aldrich). Os valores de lignina foram expressos em porcentagem por tecido caulinar.

4.10. Dosagem de Lignina pelo Método Klason

A dosagem seguiu o protocolo de Rogers *et al.* (2005). Em tubos de ensaio, a cada 0,2 g de material seco, preparado conforme citado anteriormente, adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72%, que foram homogeneizados em vórtex e mantidos em banho-maria frio (20 °C) por 2 horas, sendo agitados por 1 min a cada 10 min. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos de 125 mL, utilizando-se 112 mL de água MilliQ para lavagem dos resíduos dos tubos de reação. Os tubos de 125 mL contendo as amostras foram selados e autoclavados a 121°C por 60 min. As amostras foram resfriadas no ambiente e os hidrolisados foram filtrados a vácuo em filtro de vidro (filtro 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 em estufa a 105°C e pesados. Lignina Klason (lignina insolúvel em ácido) foi determinada

gravimetricamente a partir da diferença do peso final do filtro com seu peso inicial. O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado a partir da absorbância do filtrado dos filtros de vidro em 205 nm de acordo com TAPPI Useful Method UM250 (TAPPI, 1985).

4.11. Extração de Ligninas por Tioacidólise

A composição monomérica do polímero da lignina foi avaliada a partir da lignina extraída por tioacidólise. Este método extrai a lignina degradando-a por quebra seletiva das ligações β -O-4, permitindo a quantificação específica dos monômeros de lignina envolvidos nestas ligações, ou seja, permite a quantificação dos monômeros incorporados no polímero de lignina via ligações β -O-4. A tioacidólise foi realizada de acordo com Lapierre *et al.* (1999), com algumas modificações, como se segue: Em tubo de ensaio de tampa rosqueada e com teflon internamente, adicionaram-se 10 mL de trifluoreto de boro eterato (BF₃ eterato) / etanotiol (EtSH) / dioxano (2,5:10:87,5 ; v/v/v) a 15 mg de material moído preparado conforme descrito anteriormente. O tubo foi incubado a 100°C (banho de glicerina) por 4 horas e, após o resfriamento, o volume da reação foi diluído com 30 mL de água deionizada e o pH foi ajustado para 3 ou 4 com solução aquosa de 0,4 M de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). A mistura da reação foi extraída três vezes com 30 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) e acrescentou-se a este extrato sulfato de sódio anidro, cuja função é retirar a água presente. Em seguida, procedeu-se a filtração destas soluções utilizando-se funis de papel. Os filtrados foram deixados secar “overnight” no fluxo de uma capela, na temperatura ambiente. O resíduo final foi ressuspensionado em 0,2 mL de CH₂Cl₂ e 20 μ l de cada amostra foi derivatizada com 50 μ l de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida e 10 μ l de piridina por 1 h em temperatura ambiente. O produto desta reação foi analisado por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS).

4.12. Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS)

Os derivados de trimetilsilil dos monômeros tioetilados guaiacil e siringil foram analisados usando algumas das condições previamente descritas em Müsel *et al.* (1997). Foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massas (Shimadzu GCMS-QP 2010) equipado com um auto-injetor Split AOC-2i - Shimadzu, com fonte de ionização por elétrons operando com uma energia de ionização de 70eV. Amostras sililadas (2-3 μ l) foram injetadas em coluna capilar de sílica (DB-5; 30 m de comprimento; 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura do filme; J & W Scientific, USA) e eluídas com hélio (18,3 mL min⁻¹) como gás de arraste, usando temperatura do injetor de 260°C, com o divisor (split) do injetor configurado em 1:30, e um programa de temperatura de 160°C para 260°C a 2°C min⁻¹; temperatura da fonte de ionização: 200°C. Os monômeros da lignina, guaiacil (G) e siringil (S), analisados como seus derivados trimetilsililados, foram identificados por comparação de seus tempos de retenção e espectros de fragmentação de massas com aqueles obtidos a partir de compostos padrões de alcoóis coniferílico e sinapílico (Sigma-Aldrich) e também através de espectros de referência previamente descritos na literatura (Rolando *et al.*, 1992). A quantificação dos principais monômeros derivados da lignina, G e S, foi realizada a partir de cromatogramas de íons específicos reconstruídos a m/z de 269 para os monômeros G, e m/z de 299 para monômeros S e foi baseado no método da calibração externa usando padrões comerciais dos monômeros de lignina para a construção das curvas de calibração.

4.13. Extração de Ligninas e Análise em Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas (LC-MS)

Para a análise no LC-MS, foi realizada uma extração etanólica de lignina utilizando-se 20 mg de amostra previamente macerada e liofilizada. Cada amostra foi extraída em ultra-som

com 0,5 mL de etanol 80%, durante 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi seco em speed vac (Savant). O pellet seco foi ressuspendido em 0,4 mL de água deionizada e 0,4 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 12.000 rpm por 1 min para a separação das fases. Coletou-se a fase apolar (acetato de etila) que foi seca em fluxo de ar em capela. O resíduo seco, contendo lignina, foi solubilizado em 300 µL de uma mistura de acetonitrila e água (1:2, v/v). A amostra foi agitada em vortex e retirou-se 150 µL para análise no LC-MS.

Na análise no LC-MS, foram injetados 10 µL de amostra num Acquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massas TQD triplo quadrupolo (Micromass-Waters, Manchester, England). A separação cromatográfica foi feita usando uma coluna Waters Acquity C18-BEH (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) com eluição em um gradiente de 5 a 100% de acetonitrila (Solvente B) em 8 min, e usando água milli-Q com 0,1% de ácido fórmico como solvente A. O fluxo do solvente foi de 0,200 mLmin⁻¹ e temperatura de coluna de 30°C. A ionização no electrospray foi em modo negativo: capilar 3,0 kV, cone 50 V, temperatura na fonte de ionização de 150°C e temperatura de dessolvatação de 300°C. Os espectros MS/MS foram obtidos por dissociação por colisão induzida (CID) com energia de colisão de 20V.

4.14. Ensaios de Digestibilidade de Celulose

Este procedimento descreve a sacarificação enzimática da celulose até glicose com o objetivo de determinar a extensão máxima possível de digestibilidade (Brown e Torget, 1996). Para a realização desta análise foi utilizado o método descrito por Brown e Torget (1996) com algumas modificações, conforme segue. Foram pesados, em duplicata, 5 mg de cada amostra biológica, previamente preparadas como descrito anteriormente, e a estas foi adicionado 0,5 mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,8), 50 µL de azida sódica 2% e 0,435 mL de água

deionizada. A mistura foi aquecida a 50°C e em seguida acrescentou-se 10 µL de uma mistura de enzimas celulase e celobiose (1:1, v/v). Este coquetel foi preparado a partir de celobiose de *Aspergillus niger* e celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas a 50°C por 24 horas e em seguida foram centrifugadas a 12.000 rpm 15'. A determinação de glicose foi feita no sobrenadante (Nelson, 1944; Somogyi, 1945). Nesta análise foram utilizadas 10 µL do sobrenadante, aos quais se adicionaram 490 µL de água deionizada e 500 µL da solução cúprica de Somogy. As amostras foram incubadas a 100°C por 10 min e imediatamente foram resfriadas em banho de gelo, adicionando-se em seguida 500 µL da solução de Nelson e 1 mL de água deionizada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 560nm e os dados de absorbância aplicados em curva de calibração obtida com glicose.

4.15. Planejamento de Primers

Foram feitas pesquisas de sequências (“data Mining”) no banco de dados privativo da empresa Fibria Celulose SA. As buscas foram realizadas utilizando-se como palavras-chave os nomes das enzimas envolvidas na rota da biossíntese de lignina. Os “clusters” que retornaram da busca possuíam consensos de alinhamento compostos por “reads” pertencentes a diversas espécies de eucaliptos. Assim, procedeu-se a separação e a seleção apenas dos “reads” que correspondiam à espécie *E. globulus* e ao híbrido denominado *E. urograndis*. Estas sequências selecionadas foram, então, comparadas e agrupadas para formação de “contigs”, com o auxílio do algoritmo CAP3 do programa BioEdit (Hall, 1999). Foram feitos “contigs” com sequências de *E. globulus* e de *E. urograndis*. Os “contigs” formados foram comparados dentro de cada espécie/híbrido com utilização do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) e também com sequências depositadas no banco de dados públicos NCBI, através do programa BLAST, para confirmação da identidade das enzimas. “Primers” para análises em RT-PCR em tempo real

foram obtidos utilizando-se o programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Foram desenhados 29 pares de primers para *E. globulus* (tabela 3) e 29 para *E. urograndis* (tabela 4) representativos de genes da rota biossintética de lignina. Os primers utilizados nas reações de RT-PCR quantitativo (qPCR) no híbrido denominado *E. uroglobulus* foram os mesmos desenhados para a espécie *E. globulus*.

Desta maneira, foram desenhados primers para genes que codificam as seguintes enzimas da rota de biossíntese de ligninas de *Eucalyptus*: Fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.5), Cinamato 4-hidroxilase (C4H; EC: 1.11.13.11), 4-Hidroxicinamoil CoA ligase (4CL; EC 6.2.1.12), Hidroxicinamoil CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT; EC: 2.3.1.-), *p*-Cumarato 3- hidroxilase (C3H; EC: 1.14.18.1), Cafeoil-CoA *O*-metiltransferase (CCoAOMT; EC 2.1.1.104), hidroxicinamoil-CoA redutase (CCR; EC 1.2.1.44), Ferulato 5-hidroxilase (F5H; EC 1.14.13.-), Ácido cafeico *O*-metiltransferase (COMT; EC 2.1.1.68), Cinamil álcool desidrogenase (CAD; EC 1.1.1.195), Chitinase (CHIT; EC 3.2.1.14), Lacase (LACA; EC 1.10.3.2), peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) e para proteínas dirigentes (DIRI).

Foram desenhados também 10 pares de primers de expressão constitutiva em eucaliptos (tabela 5). Os pares de primers representativos de genes constitutivos foram: Fator de Elongação 1 α (EF1 α), Ubiquitina C, Actina, Proteína SAND, NADP-isocitrato desidrogenase (Icdh), Histona H2B (H2B), α -Tubulina, Ribossomal 18S e Tubulina β .

Tabela 3. Primers representativos de genes da biossíntese de lignina, desenhados utilizando-se seqüências de *E. globulus*.

| Genes <i>E. globulus</i> | Nome do Primer | Direção | Seqüência (5'-3') | T (°C) | Fragmento a ser amplificado (pb) |
|--------------------------|-----------------|---------|-----------------------|--------|----------------------------------|
| PAL0 | Glob_PAL0_F | Forward | CAAGCTCCTCAACCACAACA | 60 | 195 |
| | Glob_PAL0_R | Reverse | AAGAAGCCCGTGTCATCC | 60 | |
| PAL1 | Glob_PAL1_F | Forward | CCAGATCAAGGAATGCAGGT | 60 | 133 |
| | Glob_PAL1_R | Reverse | AGCACAGATCGCAGTGAAGA | 60 | |
| PAL3 | Glob_PAL3_F | Forward | ACAGGTTTCGTGAGGGAAGAG | 60 | 134 |
| | Glob_PAL3_R | Reverse | CAAGCACTCCAGCAAAGGA | 60 | |
| C4H0 | Glob_C4H0_F | Forward | GACAATCGAAGCTCGACACC | 60 | 140 |
| | Glob_C4H0_R | Reverse | TGAAATCAACAGCCACCAAA | 60 | |
| HCT1 | Glob_HCT1_F | Forward | CAGGTGACCTCCAATCCAAG | 60 | 138 |
| | Glob_HCT1_R | Reverse | CTCGGACAAGGGCTGATAGA | 60 | |
| C3H0 | Glob_C3H0_F | Forward | ACGTGAAGGTCAGGAAGGTG | 60 | 138 |
| | Glob_C3H0_R | Reverse | CCGAATTATCAGGGTTGGTG | 60 | |
| C3H1 | Glob_C3H1_F | Forward | CTGCCATGGTCGAGTCTCTT | 60 | 135 |
| | Glob_C3H1_R | Reverse | TCACGAACCTTCCCAAAC | 60 | |
| 4CL1 | Glob_4CL1_F | Forward | ATTGTCGATCGGTTGAAGGA | 60 | 174 |
| | Glob_4CL1_R | Reverse | GGAACCATTGGATTTCACCA | 60 | |
| CCR0 | Glob_CCR0_F | Forward | GCAAGGATTTCCACCACATC | 60 | 153 |
| | Glob_CCR0_R | Reverse | AGCCAAGACCTACGCCAAT | 60 | |
| CCR1 | Glob_CCR1_F | Forward | CTGCTCTGTTCTGCTGCTTG | 60 | 186 |
| | Glob_CCR1_R | Reverse | CGTCTACCTGGGACGAGATG | 60 | |
| COMT0 | Glob_COMT0_F | Forward | ACATGATGCAGTCGATGTGG | 60 | 142 |
| | Glob_COMT0_R | Reverse | GACCATTTGTCGAAGTTCCT | 60 | |
| COMT1 | Glob_COMT1_F | Forward | TTCCCAACAATGGAAGGTG | 60 | 187 |
| | Glob_COMT1_R | Reverse | ACTTGAAGCCCTGAAATCC | 60 | |
| COMT2 | Glob_COMT2_F | Forward | TAGAGCTCGAGTGGTTTGG | 60 | 170 |
| | Glob_COMT2_R | Reverse | ATGGAGGGTTCTCTCGCTAC | 60 | |
| CCoAOMT0 | Glob_CCoAOMT0_F | Forward | CGGTGGCAAGGAGAGAGTAG | 60 | 158 |
| | Glob_CCoAOMT0_R | Reverse | CATGAAGGAGCTCAGGGAAA | 60 | |
| CCoAOMT1 | Glob_CCoAOMT1_F | Forward | CAGCTCGTGCAAGATGAGAA | 60 | 101 |
| | Glob_CCoAOMT1_R | Reverse | AGGTCGATCAGCCTCTGTG | 60 | |
| CCoAOMT2 | Glob_CCoAOMT2_F | Forward | CGGTGGCAAGGAGAGAGTAG | 60 | 158 |
| | Glob_CCoAOMT2_R | Reverse | CATGAAGGAGCTCAGGGAAA | 60 | |
| F5H0 | Glob_F5H0_F | Forward | CGTCCCTCTTCTCCTCTCC | 60 | 102 |
| | Glob_F5H0_R | Reverse | ATGAGCATGTTCCCGATGAC | 60 | |
| CAD0 | Glob_CAD0_F | Forward | GGACTTGATGGAGCGAAAGA | 60 | 117 |
| | Glob_CAD0_R | Reverse | AAAGGGAGAGGCAGTGTGAA | 60 | |
| CAD1 | Glob_CAD1_F | Forward | CGGTATAGTGGTTGGGTGCT | 60 | 198 |
| | Glob_CAD1_R | Reverse | GCTGCCTGTTCCGACTCTAA | 60 | |
| CAD5 | Glob_CAD5_F | Forward | GTGCCTGTGTTTACCCTCT | 60 | 179 |
| | Glob_CAD5_R | Reverse | TCGAGCATCTCCTTGGTCTC | 60 | |
| LACA0 | Glob_LACA0_F | Forward | CGTTCATACCCTTCCCTAA | 60 | 103 |
| | Glob_LACA0_R | Reverse | GGACTTGATGGCTTGCTTGA | 60 | |
| LACA1 | Glob_LACA1_F | Forward | CGTCCGATCTTCCAAAGTGT | 60 | 113 |
| | Glob_LACA1_R | Reverse | GAAAGCAGCAGGATTGAAGTG | 60 | |
| LACA2 | Glob_LACA2_F | Forward | GACCATGAACGGCACTAAGG | 60 | 133 |
| | Glob_LACA2_R | Reverse | GCCACACCCGAAGAAGTTG | 60 | |
| LACA3 | Glob_LACA3_F | Forward | GTGCCGCTAGTCACCATCA | 60 | 194 |
| | Glob_LACA3_R | Reverse | CAAGGTCGAACAACACCA | 60 | |
| LACA6 | Glob_LACA6_F | Forward | CCGACAATCCAGGTGCTT | 60 | 101 |
| | Glob_LACA6_R | Reverse | CAATTCGCCAACTCCATTCT | 60 | |
| CHIT2 | Glob_CHIT2_F | Forward | TAGTCGGAGATGGTCTGGTTG | 60 | 100 |
| | Glob_CHIT2_R | Reverse | AGCCGGTGGTGAAGATAGTG | 60 | |
| POX3 | Glob_POX3_F | Forward | CTCTGGATAGAGCCGGTGAA | 60 | 196 |
| | Glob_POX3_R | Reverse | TGGGAGGAGAGATGGTAGGA | 60 | |
| POX4 | Glob_POX4_F | Forward | GTCTCGGCAAAGCTAGTGA | 60 | 166 |
| | Glob_POX4_R | Reverse | CACCACAACTCCACCAACA | 60 | |
| DIRIO | Glob_DIRIO_F | Forward | CGAACGAGTCCGTATCAG | 60 | 132 |
| | Glob_DIRIO_R | Reverse | AGCACACGGGTAGCTTGAAC | 60 | |

Tabela 4. Primers representativos de genes da biossíntese de lignina, desenhados utilizando-se sequências do híbrido denominado *E. urograndis*.

| Genes <i>E. urograndis</i> | Nome do Primer | Direção | Sequência (5'-3') | T (°C) | Fragmento a ser amplificado (pb) |
|----------------------------|----------------|---------|-----------------------|--------|----------------------------------|
| PAL0 | Ugr_PAL0_F | Forward | AGCTTGTGGGTCAAGTGGTC | 60 | 197 |
| | Ugr_PAL0_R | Reverse | ATCGAGCACGGGTCTTTG | 60 | |
| PAL2 | Ugr_PAL2_F | Forward | CCCAACCAGATCAAGGAATG | 60 | 139 |
| | Ugr_PAL2_R | Reverse | CAGCACAGATCGCAGTGAAG | 60 | |
| C4H1 | Ugr_C4H1_F | Forward | TGAAATCAACAGCCACCAAA | 60 | 130 |
| | Ugr_C4H1_R | Reverse | GCTCGACCACTGAGAAGG | 60 | |
| HCT0 | Ugr_HCT0_F | Forward | CCATCCTCCTCTCCTCTCC | 60 | 172 |
| | Ugr_HCT0_R | Reverse | ACTCTCGCACGCTGACAATC | 60 | |
| C3H0 | Ugr_C3H0_F | Forward | CCGAATTATCAGGGTTGGTG | 60 | 138 |
| | Ugr_C3H0_R | Reverse | ACGTGAAGGTGAGGAAGGTG | 60 | |
| 4CL0 | Ugr_4CL0_F | Forward | ATCACCGAGGACGAAATCAA | 60 | 155 |
| | Ugr_4CL0_R | Reverse | TTGTAACACCAGAGGCCAAC | 60 | |
| CCR0 | Ugr_CCR0_F | Forward | GACATTCGTTTCTGCCAAC | 60 | 199 |
| | Ugr_CCR0_R | Reverse | AGATTCGGTGCCTATTCAGG | 60 | |
| CCR1 | Ugr_CCR1_F | Forward | TGCTCTGTCTGCTGCTTG | 60 | 186 |
| | Ugr_CCR1_R | Reverse | CGTCTACCTGGGACGAGATG | 60 | |
| COMT0 | Ugr_COMT0_F | Forward | CGGGAAAGAGAGGACACAGA | 60 | 69 |
| | Ugr_COMT0_R | Reverse | ACTTGGAGCCCTGAAATCC | 60 | |
| CCoAOMT0 | Ugr_CCoAOMT0_F | Forward | GGCCACAAGTCTCTCCTCA | 60 | 68 |
| | Ugr_CCoAOMT0_R | Reverse | CTTGGGTACACGCTGGTCTC | 60 | |
| CCoAOMT2 | Ugr_CCoAOMT2_F | Forward | CAGGAACTGCCCTTCATCAG | 60 | 107 |
| | Ugr_CCoAOMT2_R | Reverse | CCAGCGTCTACCCAAGAGAG | 60 | |
| F5H0 | Ugr_F5H0_F | Forward | CCCAGGGAAGAGGAGAAGAG | 60 | 150 |
| | Ugr_F5H0_R | Reverse | GATGGGTTCGCTTAAATCC | 60 | |
| F5H2 | Ugr_F5H2_F | Forward | CGTCGTCCTCTCTCCTCT | 60 | 199 |
| | Ugr_F5H2_R | Reverse | GGCAACCATGTGCAGGAA | 60 | |
| CAD0 | Ugr_CAD0_F | Forward | GCTCCATCAAGTCCAAGCAA | 60 | 185 |
| | Ugr_CAD0_R | Reverse | GAGACGAAGCGGAGAATGAG | 60 | |
| CAD2 | Ugr_CAD2_F | Forward | TGCTTGGGAGGAAATCAATC | 60 | 103 |
| | Ugr_CAD2_R | Reverse | TCGATCTGGGAAGTCAATCC | 60 | |
| CAD3 | Ugr_CAD3_F | Forward | GCCTGTGTTTCACTCTCTTG | 60 | 177 |
| | Ugr_CAD3_R | Reverse | TCGAGCATCTCTTGGTCTC | 60 | |
| CAD5 | Ugr_CAD5_F | Forward | GGGACACTCTGGGTTCTCTC | 60 | 131 |
| | Ugr_CAD5_R | Reverse | TCCCTGCACATTCCTAGTCC | 60 | |
| LACA0 | Ugr_LACA0_F | Forward | CCCACAACGAAGAAGTTGA | 60 | 154 |
| | Ugr_LACA0_R | Reverse | GACGCCGCCAAACAATAC | 60 | |
| LACA5 | Ugr_LACA5_F | Forward | TCGGAGACATTCGGTGCTAA | 60 | 181 |
| | Ugr_LACA5_R | Reverse | TACTCTGGCTCAAGGCAACC | 60 | |
| LACA7 | Ugr_LACA7_F | Forward | GTGTCCCATTCAGACCAACC | 60 | 173 |
| | Ugr_LACA7_R | Reverse | CTTCTTGTGGGTTTAGCA | 60 | |
| LACA8 | Ugr_LACA8_F | Forward | AGAGCCGCTTCTTACAC | 60 | 133 |
| | Ugr_LACA8_R | Reverse | TCTTCGTCTGGCACAACTC | 60 | |
| LACA10 | Ugr_LACA10_F | Forward | ACCATGAACGGCACCAAG | 60 | 134 |
| | Ugr_LACA10_R | Reverse | TTGCCACACCGAAGAAG | 60 | |
| CHIT0 | Ugr_CHIT0_F | Forward | CCTGGCAAGCAATACTACGG | 60 | 107 |
| | Ugr_CHIT0_R | Reverse | AGGTCCGGTCTTGAGGAG | 60 | |
| CHIT0.1 | Ugr_CHIT0.1_F | Forward | GTGGTTTCATGCGATGTCTG | 60 | 136 |
| | Ugr_CHIT0.1_R | Reverse | CCGCCAAAGGGTTCTACAC | 60 | |
| CHIT1 | Ugr_CHIT1_F | Forward | AGTCGGAGATGGTCTGGTTG | 60 | 99 |
| | Ugr_CHIT1_R | Reverse | AGCCGGTGGTGAAGATAGTG | 60 | |
| POX2 | Ugr_POX2_F | Forward | GGTTCACCGGCTCTATCCA | 60 | 113 |
| | Ugr_POX2_R | Reverse | TCACGTA CTGCACAGCCTTC | 60 | |
| POX4 | Ugr_POX4_F | Forward | GTCCTCGGCAAAGCTAGTGA | 60 | 166 |
| | Ugr_POX4_R | Reverse | CACCACAACTCCACCAACA | 60 | |
| POX8.1 | Ugr_POX8.1_F | Forward | CGGTCCCTGACTGGTTGTAG | 60 | 141 |
| | Ugr_POX8.1_R | Reverse | CCAACGCGAGCTTCTTATC | 60 | |
| DIRI0 | Ugr_DIRI0_F | Forward | ATCTTCACAGCTTGGCTTGG | 60 | 178 |
| | Ugr_DIRI0_R | Reverse | CGAACGAGTCCGTCATCAG | 60 | |

Tabela 5. Primers representativos de genes constitutivos. **Pb:** fragmento a ser amplificado.

| Gene constitutivo | Nome do Primer | Direção | Sequência (5'-3') | T (°C) | Fragmento (pb) |
|-------------------------------|----------------|---------|-------------------------------|--------|----------------|
| Fator de Elongação 1 α | EF1aF | Forward | CCTGTCTTGATTGTCACACTTCC | 60 | 130 |
| | EF1aR | Reverse | CCATTCCAGCATCACCGTTCTTC | 60 | |
| Ubiquitina C | UbiqC_glo_F | Forward | TCCGTCAAAGCGAACAGA | 60 | 173 |
| | UbiqC_glo_R | Reverse | CATTTCCCTCCAGATTACCC | 60 | |
| Ubiquitina C | UbiqC_urg_F | Forward | GGACTTTCGTTTCGTTTTGGT | 60 | 107 |
| | UbiqC_urg_R | Reverse | GTGATTTGGGGAGGGTTTG | 60 | |
| Actina | ActForward | Forward | AGATGACCCAGATTATGTTTGAGACCTTC | 60 | 122 |
| | ActReverse | Reverse | ACCATCACCAGAATCCAACACAATACC | 60 | |
| Proteína SAND | sand_F | Forward | TGGGTCACACAGGATTTTGA | 60 | 130 |
| | sand_R | Reverse | CTCCCAGCAAAAAGATCTCG | 60 | |
| NADP-isocitrato desidrogenase | icdh_F | Forward | AGTTTGAGGCTGCTGGAATC | 60 | 100 |
| | icdh_R | Reverse | CTTGCATGCCACACATAAC | 60 | |
| Histona H2B | h2b_F | Forward | AACAAGAAGCCCACCATCAC | 60 | 142 |
| | h2b_R | Reverse | ACAACCTCCTCCTCGCTCAC | 60 | |
| α -Tubulina | atub_F | Forward | CCAGTGAACAATGCCCTCT | 60 | 92 |
| | atub_R | Reverse | TGATCAGCAACAACACAGCA | 60 | |
| Ribossomal 18S | 18S2_F | Forward | CATGGCCGTTCTTAGTTGGT | 60 | 71 |
| | 18S2_R | Reverse | TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT | 60 | |
| Tubulina β | beta_Tub_xanF | Forward | GATGGGGACGCTATTGATT | 60 | 225 |
| | beta_Tub_xanR | Reverse | CTGGGTTGATGAGTTTCAGG | 60 | |

4.16. Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada de acordo com Chang *et al.* (1993), com modificações. Inicialmente, aqueceu-se a 65°C um volume de 750 μ L de tampão de extração em tubos Eppendorf de 2 mL e acrescentou-se 7,5 μ L de mercaptoetanol em cada tubo. Cerca de 100 mg de amostra macerada em N₂ líquido foi colocada no tubo, que foi agitado em vortex, resfriado na temperatura ambiente e em seguida extraído uma vez com 750 μ L de clorofórmio álcool isoamílico (24:1, v/v), sob agitação por 2 min. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, coletou-se o sobrenadante e a ele adicionou-se 188 μ L de 10M LiCl, e misturou-se bem por inversão do tubo. As amostras foram mantidas a 4°C, por 12 h para precipitação do RNA. Em seguida, centrifugaram-se as amostras a 10.000 rpm por 30 min na temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o “pellet” (RNA) em 200 μ L de tampão SSTE (mantido a 37°C). Adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1, v/v), misturando-se por inversão do tubo e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 min. Ao sobrenadante recuperado, adicionou-se 1mL de etanol absoluto e deixou-se a -20°C durante 2

horas. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4°C e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi lavado com etanol 75% e fez-se uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 20 min a 4°C, descartando-se o sobrenadante e deixando-se secar o pellet em temperatura ambiente. O RNA seco foi solubilizado em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC). A quantificação da concentração de RNA de cada amostra foi realizada utilizando-se aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen) e reagentes do kit Quant-it (Invitrogen), segundo as instruções dos fabricantes. A qualidade do RNA foi atestada em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) contendo brometo de etídio e visualização sob luz UV no fotodocumentador Gel Doc 2000 da BIO RAD.

Para a degradação do DNA residual presente nas amostras de RNA extraídas foi utilizada DNase turbo DNA-free™ (Ambion). As amostras limpas de RNA foram utilizadas na síntese da primeira fita de cDNA, que foi obtida com o uso do kit SuperScript^R VILO™ cDNA synthesis (Invitrogen). Tais procedimentos foram realizados segundo as instruções dos fabricantes.

4.17. RT-PCR Quantitativo (RT-qPCR)

As reações de qPCR, foram feitas utilizando-se o aparelho iCycler iQ5 (Bio-Rad). As reações foram feitas em volume final de 10 µL, sendo 5 µl de “QuantiFast™ SYBR Green – PCR Mix” (Qiagen), 0,4 µM (concentração final) de cada um dos primers (forward e reverse), 3µL de cDNA e 1,6 µL de água milliQ autoclavada. As condições de termociclagem tiveram um passo inicial de 95°C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 30 s e uma etapa final de 71 ciclos de 60°C por 30 s (curva de dissociação). As reações foram feitas em triplicatas biológicas e, para cada réplica biológica, foram feitas triplicatas técnicas,

permitindo a detecção de possíveis erros. Foram feitas também triplicatas de reações-controle (NTC – Non Template Control), que não contêm qualquer molde de DNA.

Os cálculos do nível de expressão de cada gene foram feitos utilizando-se o próprio software do fabricante ($2^{\Delta\Delta Ct}$) o qual segue o proposto por Livak e Schmittgen (2001). Utilizou-se o módulo de expressão normalizada, no qual os dados de expressão do gene alvo são normalizados com relação à expressão de genes de referência, constitutivos em plantas. Os genes de referência utilizados foram validados previamente utilizando-se os softwares GenNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) ou NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). A combinação dos constitutivos mais estáveis (melhor combinação) dentro de cada experimento de frio ou seca para cada espécie estão na tabela 6 e também em Moura *et al.* (2012), os quais foram utilizados como genes de referência nos cálculos de expressão.

Tabela 6. Combinação dos constitutivos mais estáveis (melhor combinação) dentro de cada experimento de estresse hídrico ou baixa temperatura, para cada espécie, os quais foram utilizados como genes de referência nos cálculos da expressão gênica normalizada.

| | Ensaio de Estresse hídrico | Método de Escolha |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| <i>E. globulus</i> | Actina e H2B | GeneNorm |
| <i>E. urograndis</i> P42 | Sand e icdh | NormFinder |
| <i>E. uroglobulus</i> | H2B e α tubulina | NormFinder |
| | Ensaio de Baixa Temperatura | Método de Escolha |
| <i>E. globulus</i> | Actina e α tubulina | NormFinder |
| <i>E. urograndis</i> P42 | β -tubulina e H2B | GeneNorm |
| <i>E. uroglobulus</i> | EF1 α e H2B | NormFinder |

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Medidas de Trocas Gasosas e Potencial Hídrico

5.1.1. Experimentos de Baixa Temperatura

Os experimentos com baixas temperaturas noturnas foram realizados com o objetivo de se modular a síntese de lignina nos eucaliptos estudados, tendo em vista que o estresse de frio é capaz de modular a síntese de lignina em diversas espécies (Anderson *et al.*, 1995; Hausman *et al.*, 2000; Zagoskina *et al.*, 2005). No decorrer destes experimentos, e previamente as análises de lignina, foram averiguadas possíveis alterações nas trocas gasosas das plantas submetidas aos tratamentos de frio. Tais medidas tiveram como objetivo indicar alterações fisiológicas nestas plantas.

Foi observado que todas as espécies apresentaram, em algum momento, reduções das taxas fotossintéticas (assimilação de CO₂) em baixa temperatura, embora isto tenha sido observado em diferentes intensidades dependendo da espécie (Figs. 4-8, a). A redução da assimilação de CO₂ foi mais frequente em *E. urograndis* P00, P42 e em *E. uroglobulus* (Figs. 4, 5, 8). Já *E. urograndis* C19 e *E. globulus* (Figs. 6-7a) apresentaram redução da taxa de fotossíntese apenas no final do experimento.

Os valores obtidos da transpiração também foram reduzidos em plantas expostas à baixa temperatura (Figs. 4-8, b), mas a espécie *E. globulus* praticamente manteve as taxas de transpiração equivalentes às das plantas-controle (Fig. 7b)

A redução da condutância estomática foi bem significativa para os três *E. urograndis* analisados (Figs. 4-6, c), mas, para *E. uroglobulus* (Fig. 8c), isto praticamente se manteve invariável e, em *E. globulus* (Fig. 7c), não foi observada alteração da condutância estomática.

Assim, observamos que a aplicação de baixa temperatura noturna é capaz de afetar a fotossíntese, a transpiração e a condutância estomática de espécies de *Eucalyptus*, sendo que neste processo algumas espécies podem ser mais sensíveis do que outras. Em nossos ensaios, *E. globulus* (Fig. 7, a-c) foi a espécie que menos apresentou alterações destas variáveis quando em baixa temperatura, sendo a única a não apresentar alterações na condutância estomática nessa condição de estresse.

As medidas de trocas gasosas indicaram alterações fisiológicas nas plantas expostas as baixas temperaturas, as quais poderiam se caracterizar como um estresse fisiológico, que por sua vez poderia alterar, dentre outros aspectos, o metabolismo de lignina, objeto de estudo do presente trabalho. Sabe-se que a redução da taxa de fotossíntese é uma resposta bastante comum em plantas submetidas a baixas temperaturas e que alterações deste tipo de troca gasosa podem afetar a biossíntese de lignina (Zagoskina *et al.*, 2005).

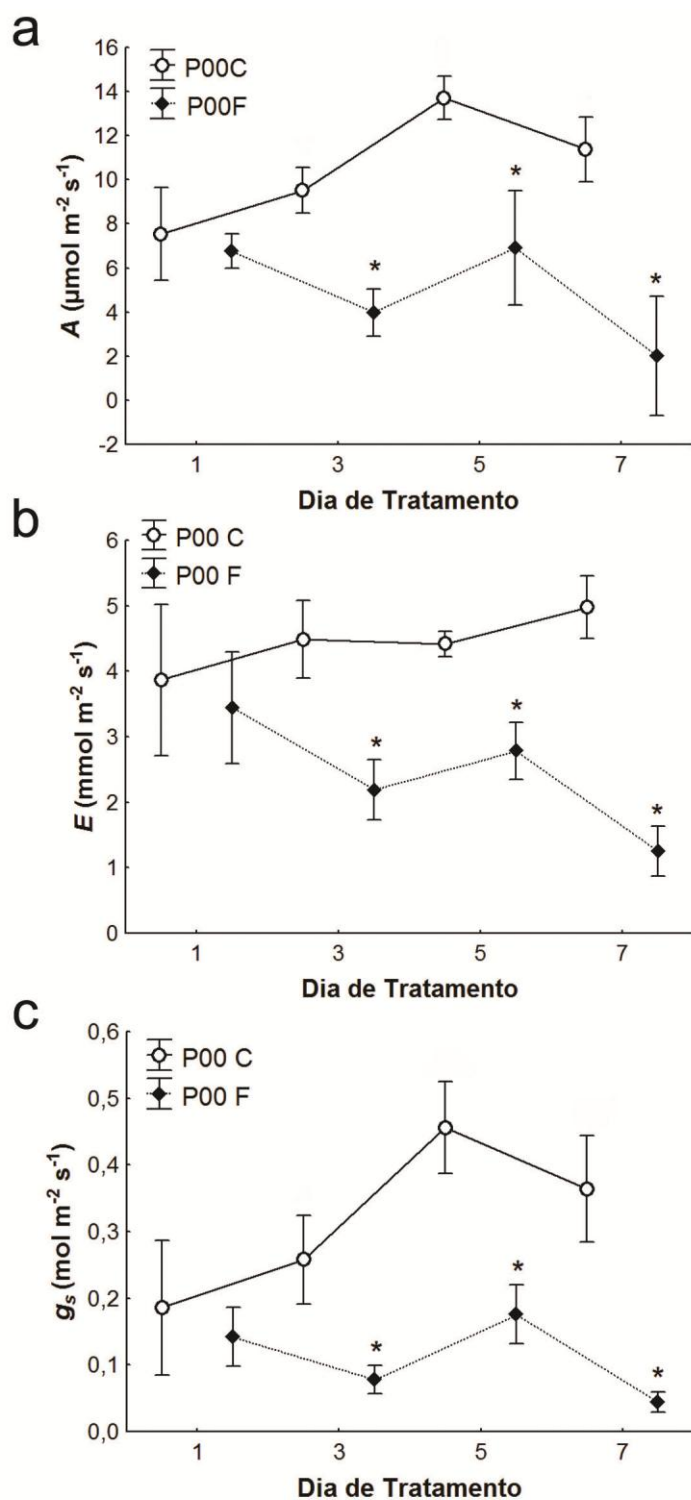


Figura 4. (a) Assimilação de CO_2 (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g_s) em *E. urograndis* P00 expostos a frio (P00F) ou controle (P00C). Médias \pm Desvio Padrão; $n=5$. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

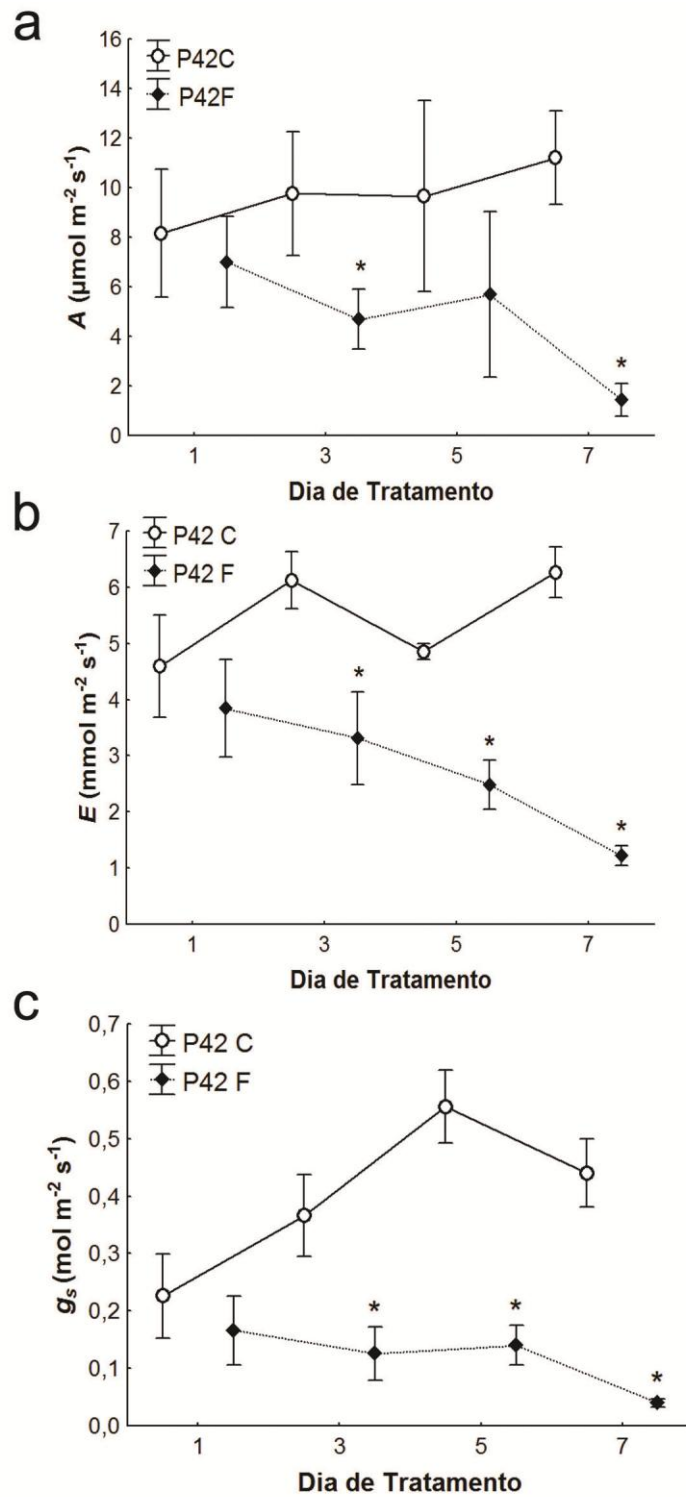


Figura 5. (a) Assimilação de CO₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g_s) em *E. urograndis* P42 expostos a frio (P42F) ou controle (P42C). Médias \pm Desvio Padrão; n=5. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

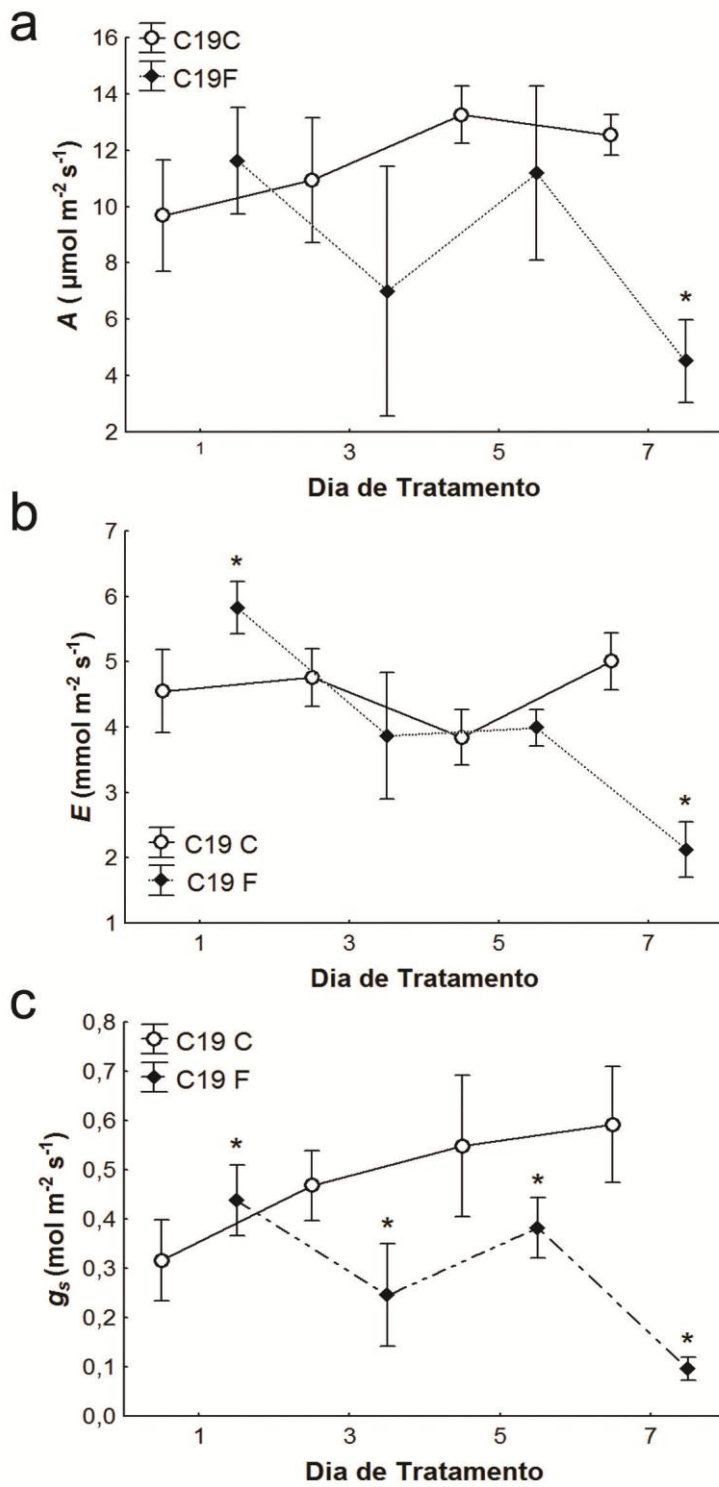


Figura 6. (a) Assimilação de CO₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g_s) em *E. urograndis* C19 expostos a frio (C19F) ou controle (C19C). Médias \pm Desvio Padrão; n=5.* Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

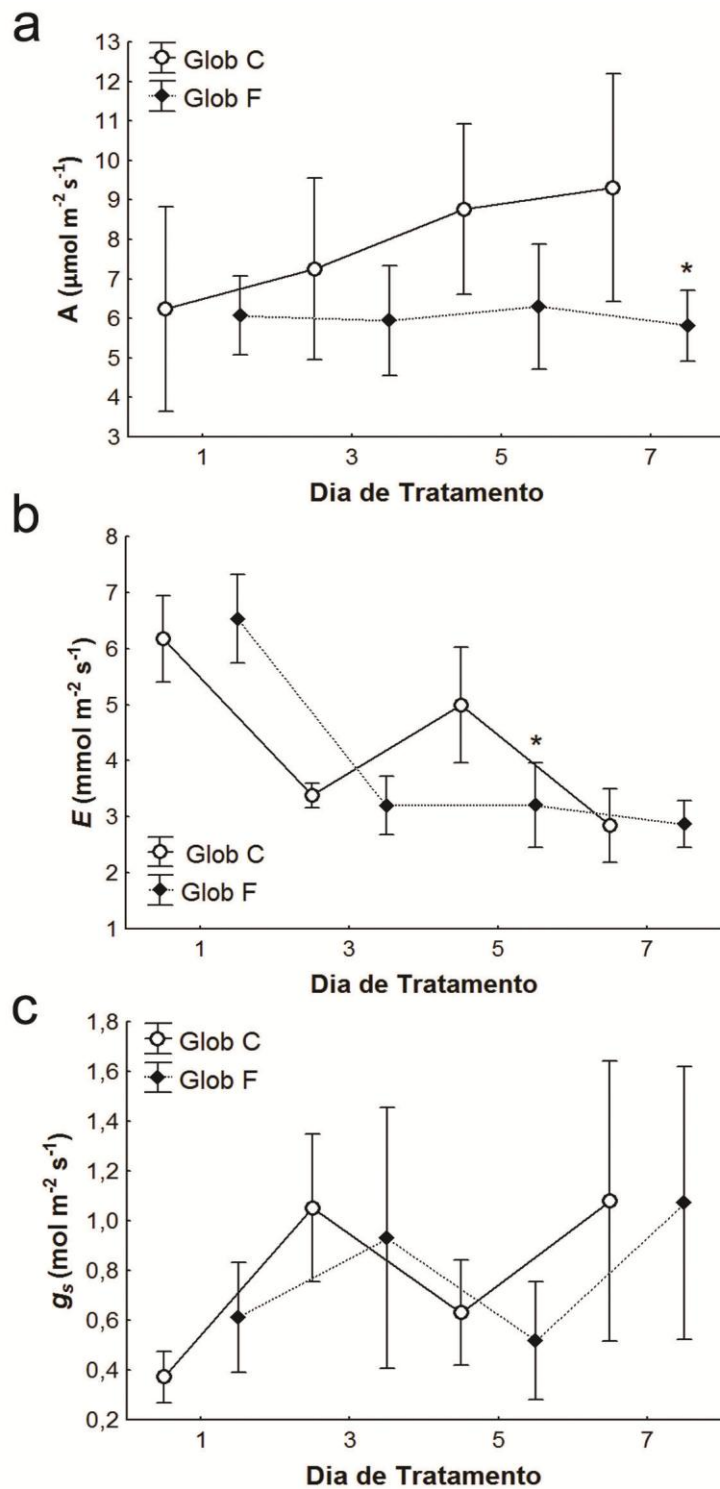


Figura 7. (a) Assimilação de CO₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g_s) em *E. globulus* (Glob) expostos a frio (GlobF) ou controle (GlobC). Médias \pm Desvio Padrão; n=5. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

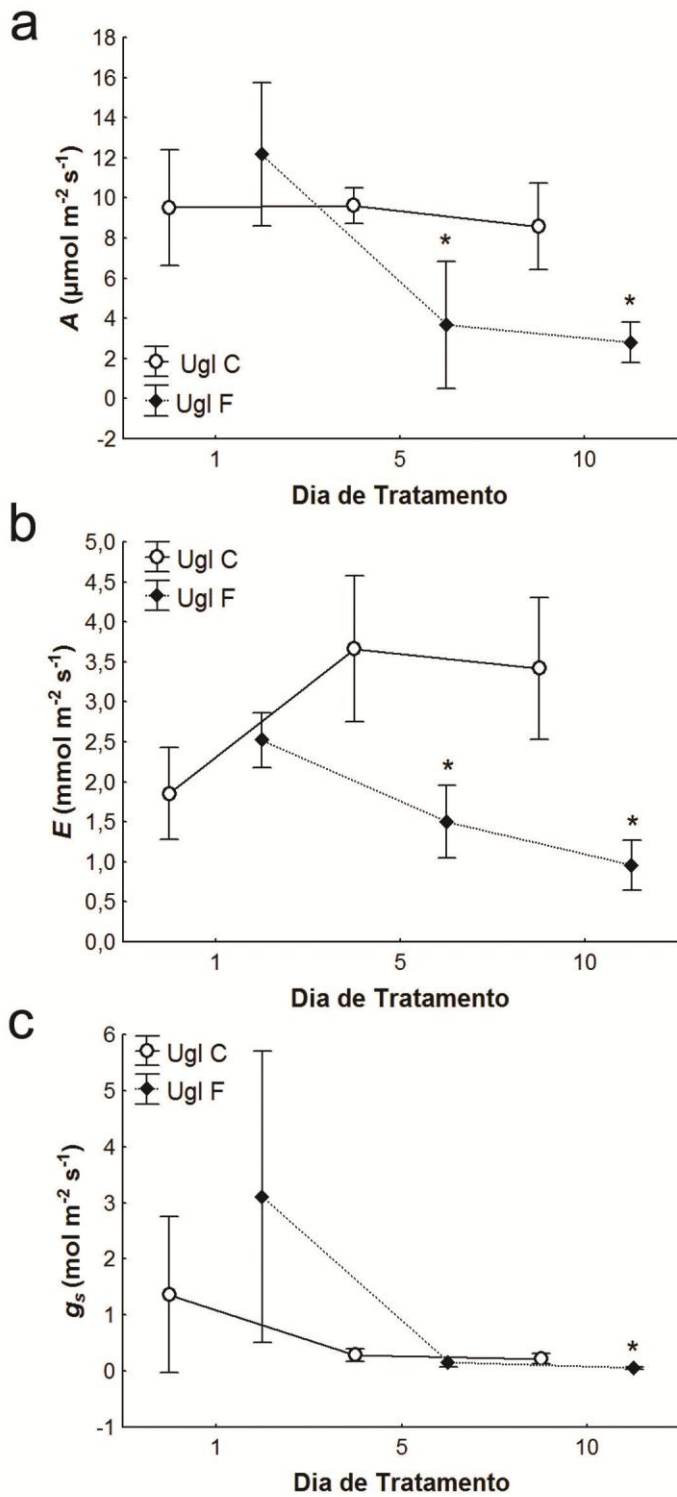


Figura 8. (a) Assimilação de CO₂ (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g_s) em *E. uroglobulus* (Ugl) expostos a frio (UglF) ou controle (UglC). Médias \pm Desvio Padrão; n=5. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

5.1.2. Experimentos de Estresse Hídrico

Os experimentos de estresse de seca, assim como os de frio, foram realizados com o objetivo de se modular a síntese de lignina nos eucaliptos estudados, tendo em vista que o estresse hídrico, assim como o estresse com baixa temperatura, é capaz de alterar a biossíntese de lignina em diversas espécies (Vincent *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006; Bok-Rye *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2008). Assim como nos experimentos com baixa temperatura, e pelo mesmo motivo mencionado para este experimento (verificação de possíveis alterações fisiológicas), foram realizadas medidas de trocas gasosas das plantas submetidas aos tratamentos de estresse hídrico. Adicionalmente, nestas plantas também foram averiguados o potencial hídrico, como medida de confirmação do status de desidratação alcançado.

Os três grupos de plantas utilizados nos ensaios de seca foram: controle, seca e seca recuperada. As plantas controle foram aquelas irrigadas diariamente. Já as plantas do grupo seca não receberam irrigação e foram coletadas assim que apresentavam sintomas de murcha confirmada. O grupo seca recuperada consistiu de algumas plantas do grupo de seca que foram irrigadas, após verificado o sintoma de murcha confirmada, sendo coletadas após a recuperação, ou seja, foram plantas submetidas a recuperação do status hídrico, e por isto a denominação “grupo seca recuperada”. Para maiores detalhes sobre cada um destes grupos ver sessão Material e Métodos.

Todas as espécies apresentaram reduções significativas das taxas fotossintéticas (assimilação de CO₂), transpiração e condutância estomática durante o tratamento de seca e estas variáveis permaneceram reduzidas no grupo seca recuperada na maioria das vezes (Fig. 9, a-c). Em *E. uroglobulus* foi observado recuperação das taxas de fotossíntese (Fig. 9a) *E. urograndis* P00 e P42 e *E. uroglobulus* recuperaram a condutância estomática (Fig. 9c).

Todas as espécies apresentaram reduções significativas do potencial hídrico foliar (Fig. 10). Para as espécies *E. uroglobulus* e *E. globulus*, as únicas nas quais o potencial hídrico foliar foi avaliado no grupo seca recuperada, foi possível observar que o potencial hídrico foliar deste grupo retornou aos níveis do controle em *E. globulus*.

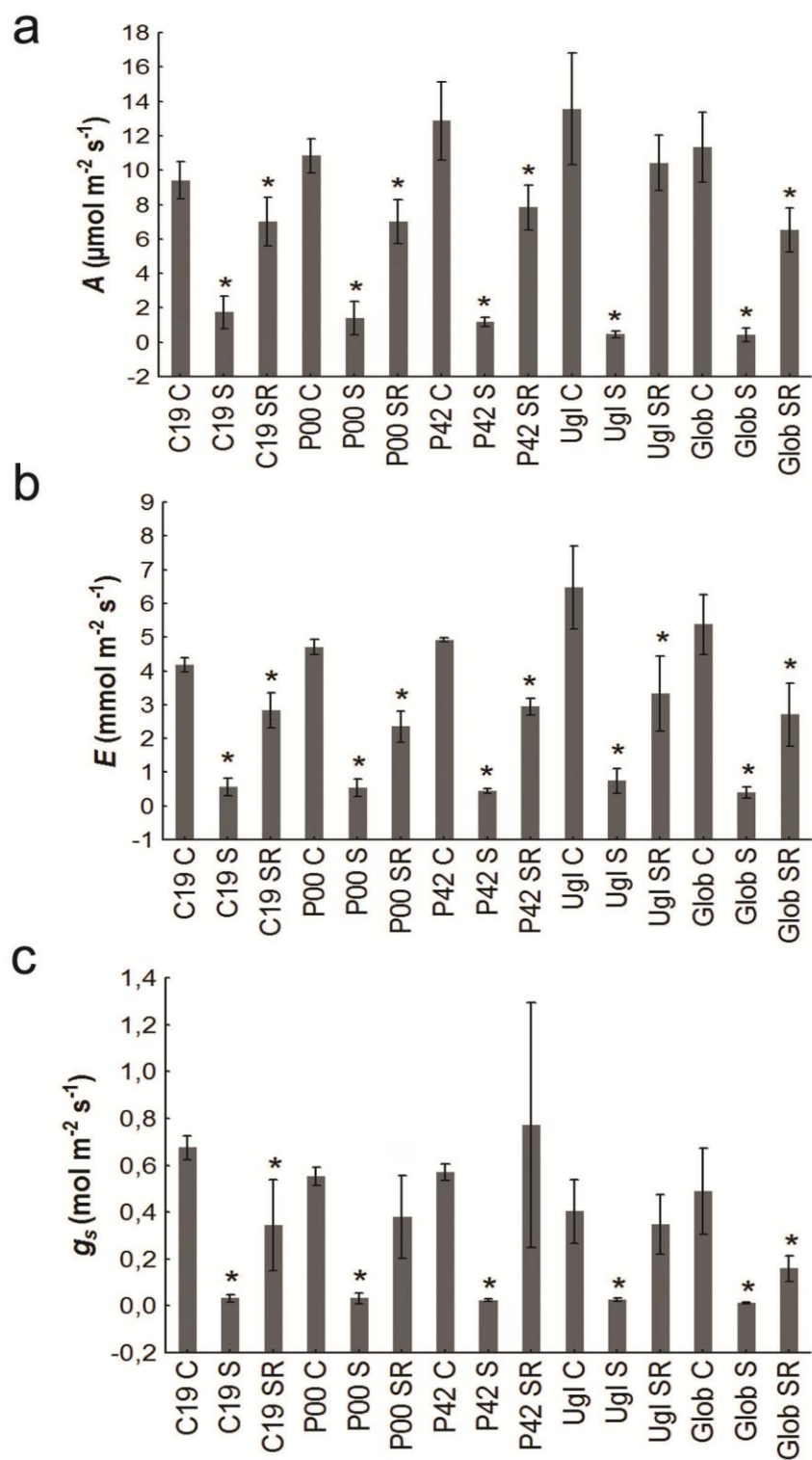


Figura 9. (a) Assimilação de CO_2 (A), (b) transpiração (E) e (c) condutância estomática (g_s) em *E. urograndis* (C19, P00, P42), *E. uroglobulus* (Ugl) e *E. globulus* (Glob) expostos a seca (S), controle (C) ou seca recuperada (SR). Médias \pm Desvio Padrão; $n=5$. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

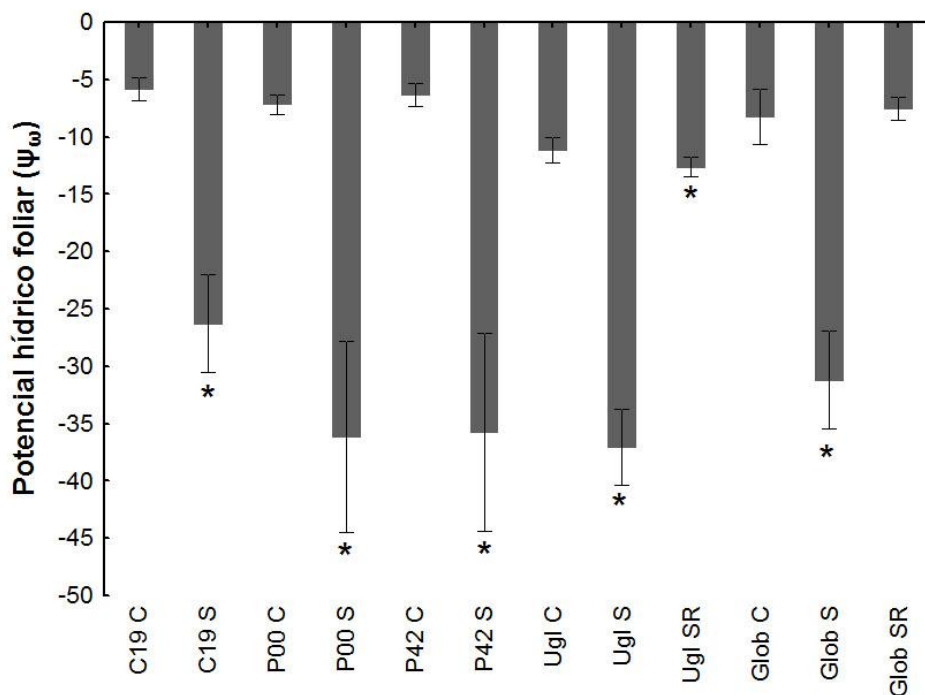


Figura 10. Potencial hídrico foliar (ψ_w) em *E. urograndis* (C19, P00, P42), *E. uroglobulus* (Ugl) e *E. globulus* (Glob) expostos a seca (S), controle (C) ou seca recuperada (SR). Médias \pm Desvio Padrão; n=5. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

5.2. Análises de Lignina e Digestibilidade de Celulose

Feito os experimentos de frio e estresse hídrico foram realizadas análises da lignina nas plantas submetidas aos diferentes estresses, com o objetivo de se verificar se os tratamentos utilizados resultaram em modulação da quantidade ou composição das ligninas. Adicionalmente verificou-se a digestibilidade da celulose nestas plantas, ou seja, o grau de sacarificação enzimática da mesma até glicose. As análises de lignina e digestibilidade de celulose foram realizadas em duas regiões distintas do caule das plantas, tendo em vista que diferentes tecidos de uma mesma planta podem apresentar, naturalmente, diferenças no conteúdo ou composição das ligninas (Önnerud e Gellerstedt, 2003) e que regiões diferentes podem apresentar respostas distintas na lignificação (Vincent *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006).

5.2.1. Dosagem de Ligninas pelo Método do Ácido Tioglicólico

O método do ácido tioglicólico envolve a formação de tioéteres do álcool benzílico, grupos tipicamente encontrados na lignina (Hatfield e Fukushima, 2005). As dosagens de ligninas pelo método do ácido tioglicólico revelaram alterações na quantidade de lignina de algumas espécies expostas aos estresses de frio ou seca, sendo que estas alterações foram significativas apenas nos ápices caulinares destas plantas (Figs. 11a e 12a). Assim, foram observadas reduções significativas da quantidade de lignina em *E. urograndis* P00 no grupo de plantas expostas à baixa temperatura (Fig. 11a) e no grupo seca recuperada (Fig. 12a). Em *E. uroglobulus* também foi observado redução significativa da quantidade de lignina no grupo seca recuperada (Fig. 12a). Já a espécie *E. globulus* apresentou aumento da quantidade de lignina nas plantas sob estresse hídrico (grupo seca) (Fig. 12a).

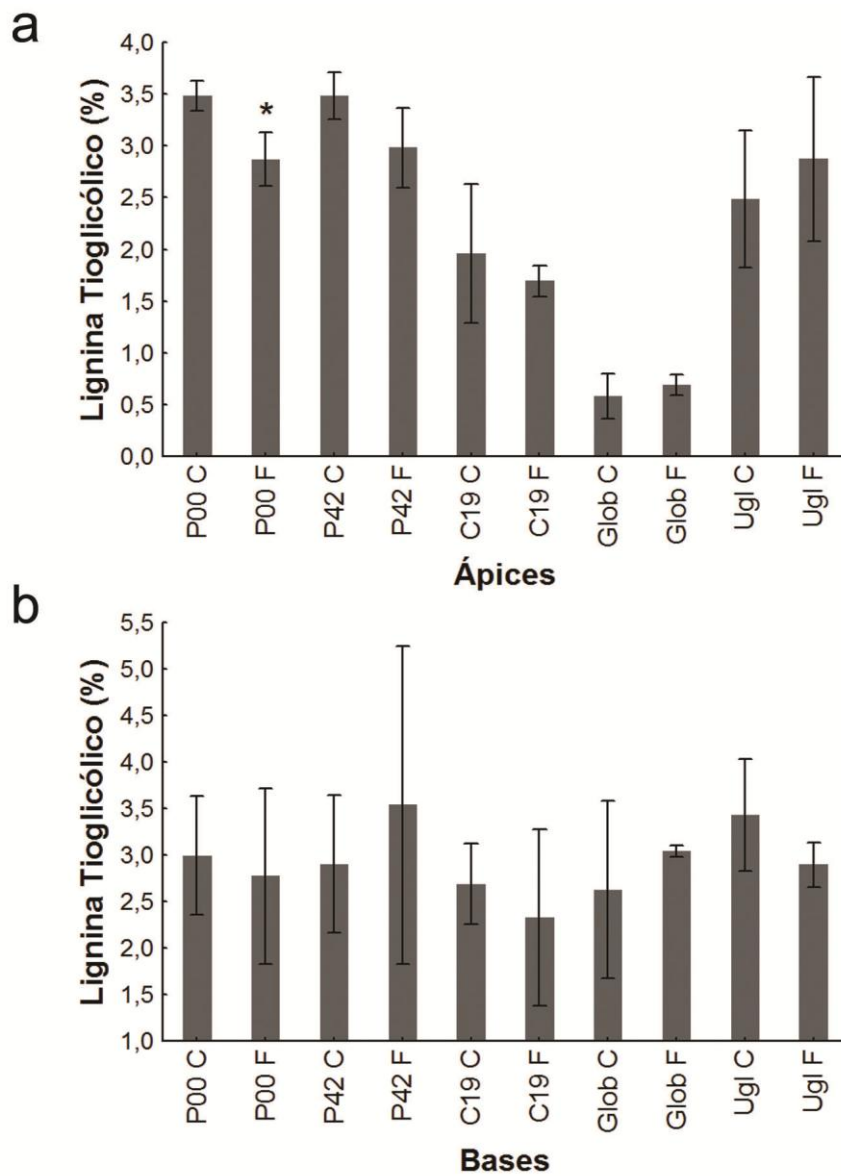


Figura 11. Dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico em ápices (a) e bases (b) caulinares de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglabulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em plantas controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

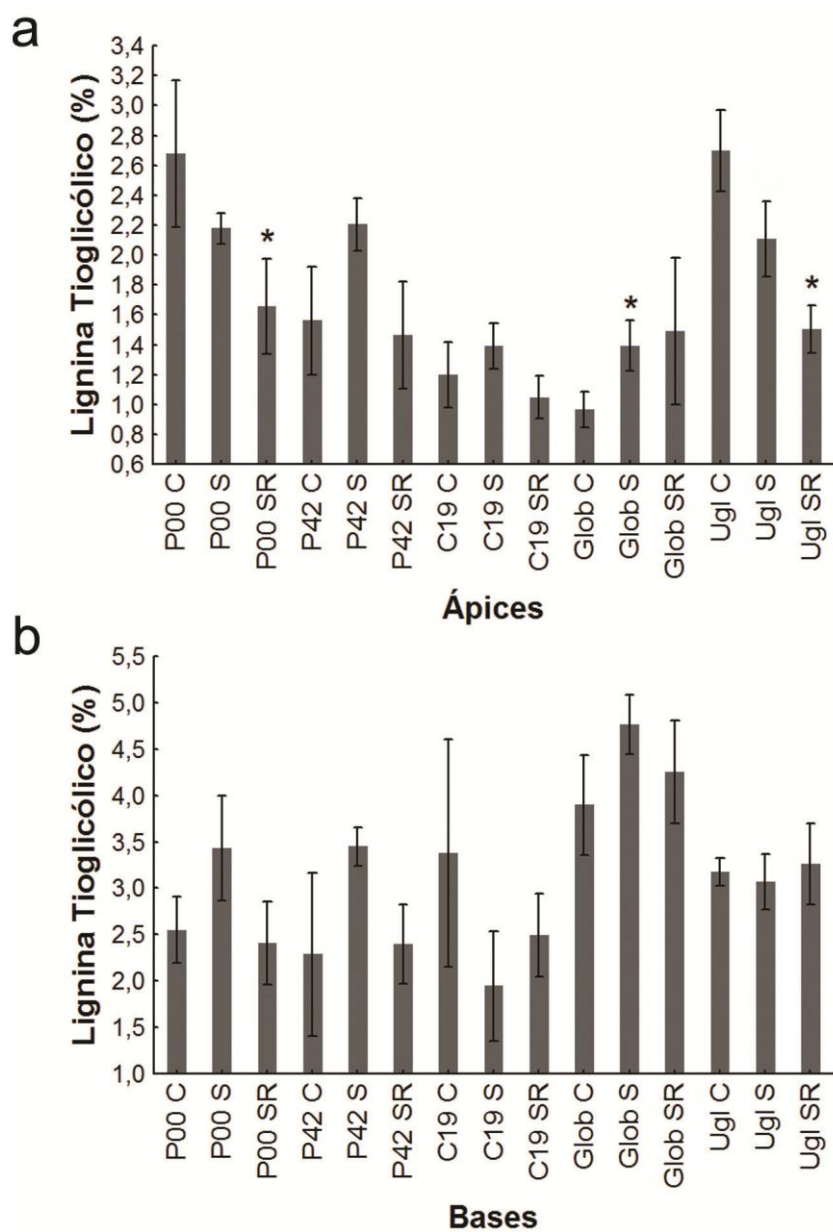


Figura 12. Dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico em ápices (a) e bases (b) caulinares de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR), ou em plantas controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

5.2.2. Método Klason de Dosagem de Ligninas

Assim como a dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico, na dosagem de lignina pelo método Klason é possível quantificar o teor de lignina nas plantas analisadas. Adicionalmente, o método de dosagem Klason, permite distinguir duas frações distintas da

lignina, a solúvel e a insolúvel em ácido sulfúrico e, também, a quantidade de lignina total que corresponde à somatória destas duas frações.

Pelo método Klason (Figs. 13-16) foi possível observar alterações na quantidade de lignina dosada tanto nos ápices quanto nas bases caulinares das plantas submetidas à baixa temperatura ou ao estresse hídrico.

E. urograndis P00 não apresentou alterações da quantidade de lignina determinada por Klason nos ápices expostos ao frio (Fig. 13). Nos ápices de *E. urograndis* P42 e C19 sob baixa temperatura (Fig. 13) foram observadas reduções da quantidade de lignina solúvel. Adicionalmente, a lignina total também foi reduzida nos ápices de C19 no frio. Os teores de lignina insolúvel e total aumentaram significativamente nas bases de C19 expostos a frio (Fig. 14).

Nos ápices das plantas expostas à seca (Fig. 15), *E. urograndis* P00 apresentou redução da quantidade de lignina solúvel no grupo seca, e aumento no grupo seca recuperada. Ainda nos ápices de P00, foi observado aumento da lignina total no grupo seca recuperada. Possivelmente, isto pode ser explicado pelo aumento significativo da lignina solúvel neste mesmo grupo, uma vez que a lignina total é representada pela somatória da lignina insolúvel e a solúvel. Em ápices de *E. urograndis* P42 (Fig. 15), também ocorreu aumento da quantidade de lignina solúvel no grupo seca recuperada, mas ocorreu redução da quantidade de lignina insolúvel neste mesmo grupo. Nas bases de *E. urograndis* no ensaio de seca (Fig. 16), todas as alterações observadas consistiram de reduções da quantidade de lignina no grupo de plantas expostas à seca. Estas alterações ocorreram nas bases caulinares dos grupos seca e seca recuperada de P42 (para lignina solúvel e total) e no grupo seca de P00 (para lignina total).

Assim, para *E. urograndis*, há redução da quantidade de lignina nos ápices em baixas temperaturas, uma vez que para os três clones isto foi observado em pelo menos um dos métodos usados. Para P42 e C19, o método Klason permitiu verificar que esta redução ocorre na fração solúvel. Além disto, verificamos que as alterações observadas em resposta ao frio nas bases caulinares constituíram-se em aumento da quantidade de lignina insolúvel e total em *E. urograndis* C19. Nos ápices caulinares dos experimentos de seca, as alterações na quantidade de lignina ocorreram, na maioria, no grupo seca recuperada, onde foi observado aumento da lignina solúvel ou total e redução da fração insolúvel ou da lignina dosada pelo método do ácido tioglicólico. Já nas bases caulinares dos ensaios de seca ocorreu redução das frações solúvel e total no grupo seca e seca recuperada.

E. uroglobulus não apresentou alterações da quantidade de ligninas determinada por Klason nos ápices expostos à seca ou à seca recuperada (Fig. 15). Além disto, a região da base caulinar (Fig. 16) apresentou aumento da quantidade de lignina (fração solúvel) no grupo seca recuperada. No experimento de frio (Figs. 13-14), tanto os ápices quanto as bases de *E. uroglobulus* apresentaram aumento da quantidade de ligninas, que foi observado em todas as frações nas bases, e na fração insolúvel e total nos ápices.

Assim, para *E. uroglobulus* no experimento de seca, os resultados dos dois métodos de dosagem utilizados complementaram-se e indicaram que, em ápices caulinares, ocorre redução da lignina pelo método do ácido tioglicólico e que, em bases caulinares, há aumento de lignina solúvel, e que ambas as alterações são observadas apenas no grupo seca recuperada. Já em *E. uroglobulus* no experimento de frio, podemos concluir que ocorreu aumento da quantidade de lignina, tanto em ápices quanto em bases caulinares, sendo que em ápices este aumento ocorreu na fração insolúvel, e nas bases caulinares isto foi observado em todas as frações.

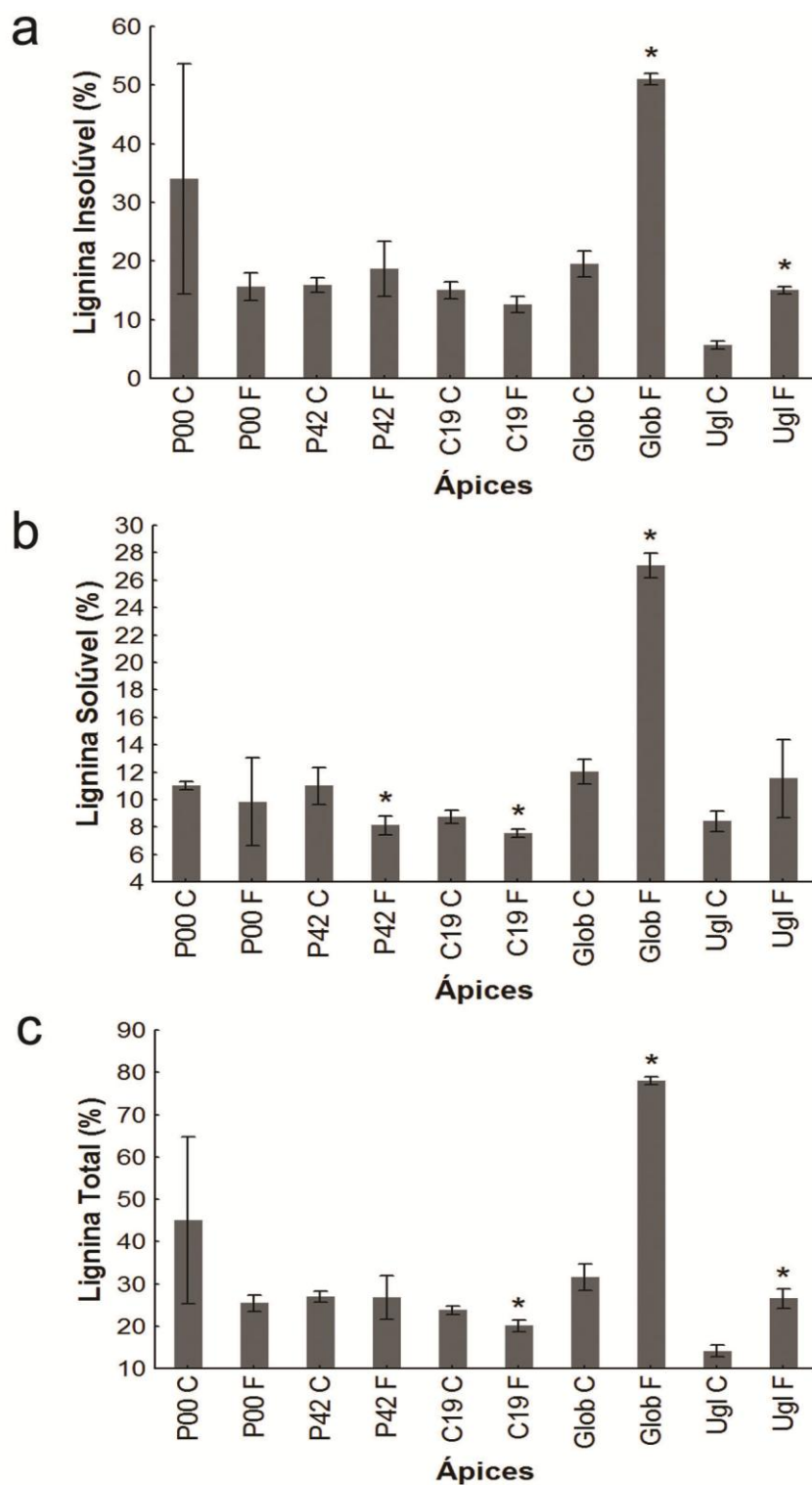


Figura 13. Dosagem de lignina pelo método Klason em ápices caulinares (a-c) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

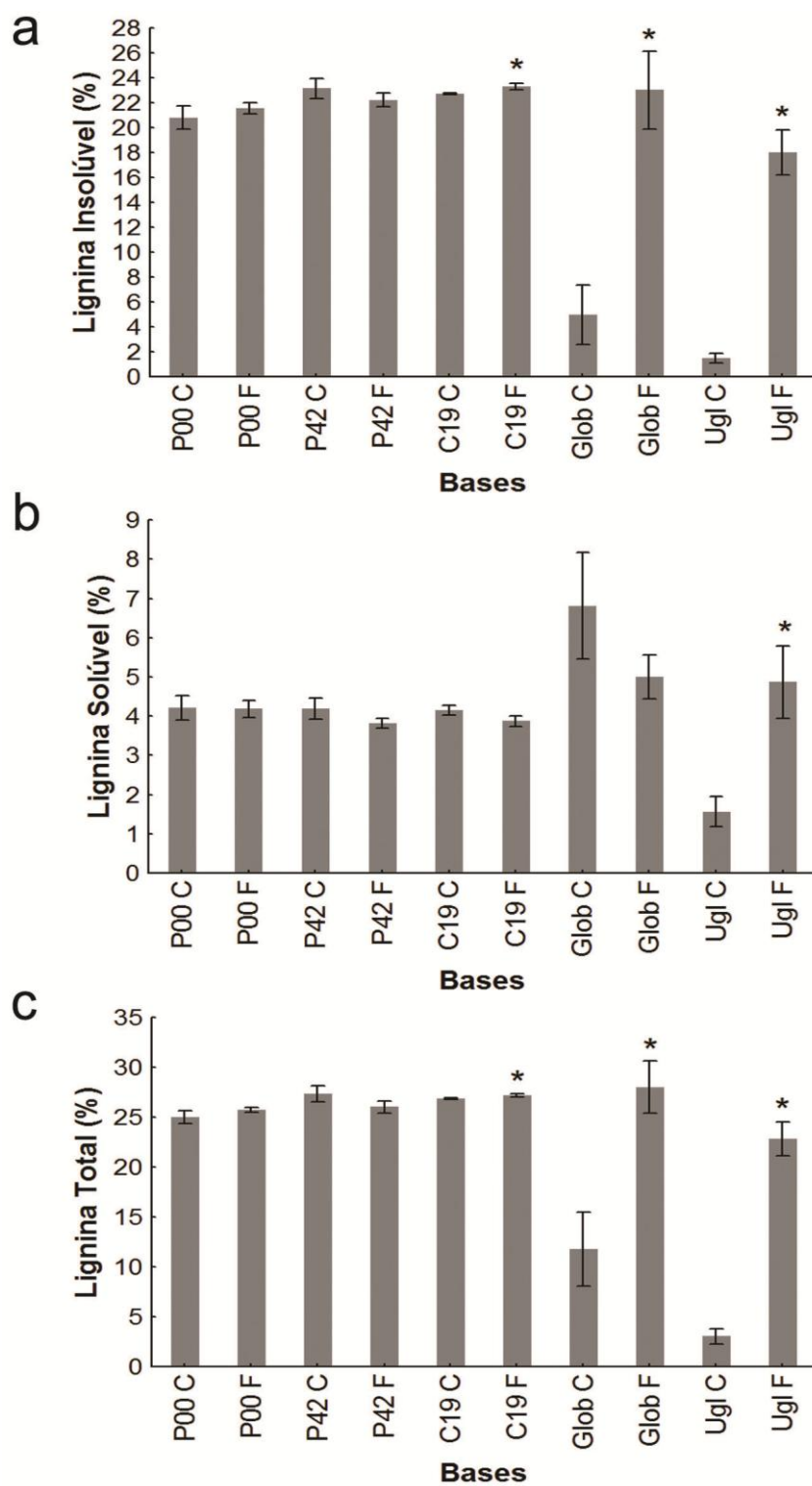


Figura 14. Dosagem de lignina pelo método Klason em bases caulinares (a-c) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

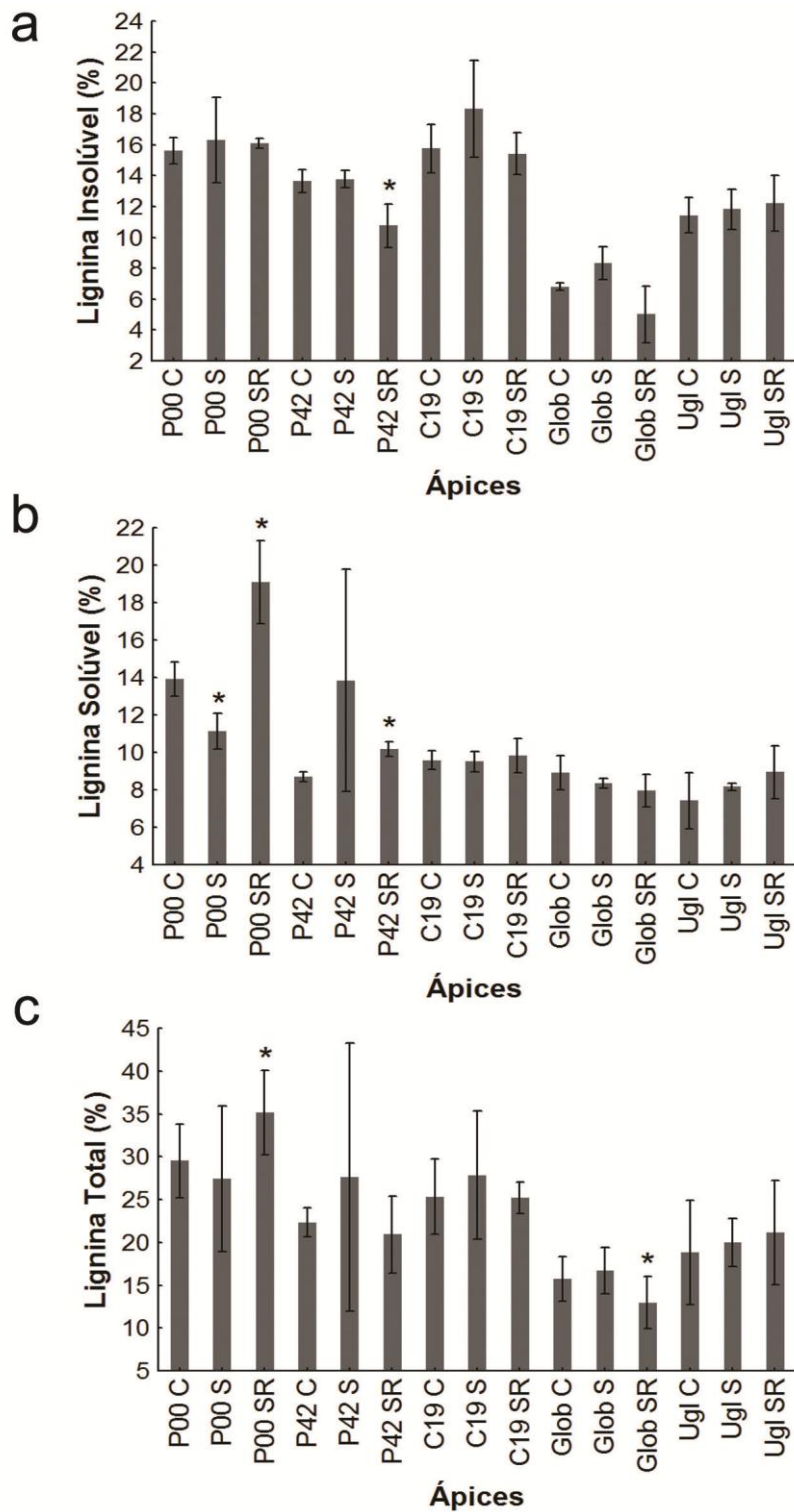


Figura 15. Dosagem de lignina pelo método Klason em ápices caulinares (a-c) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglabulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR), ou em plantas controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

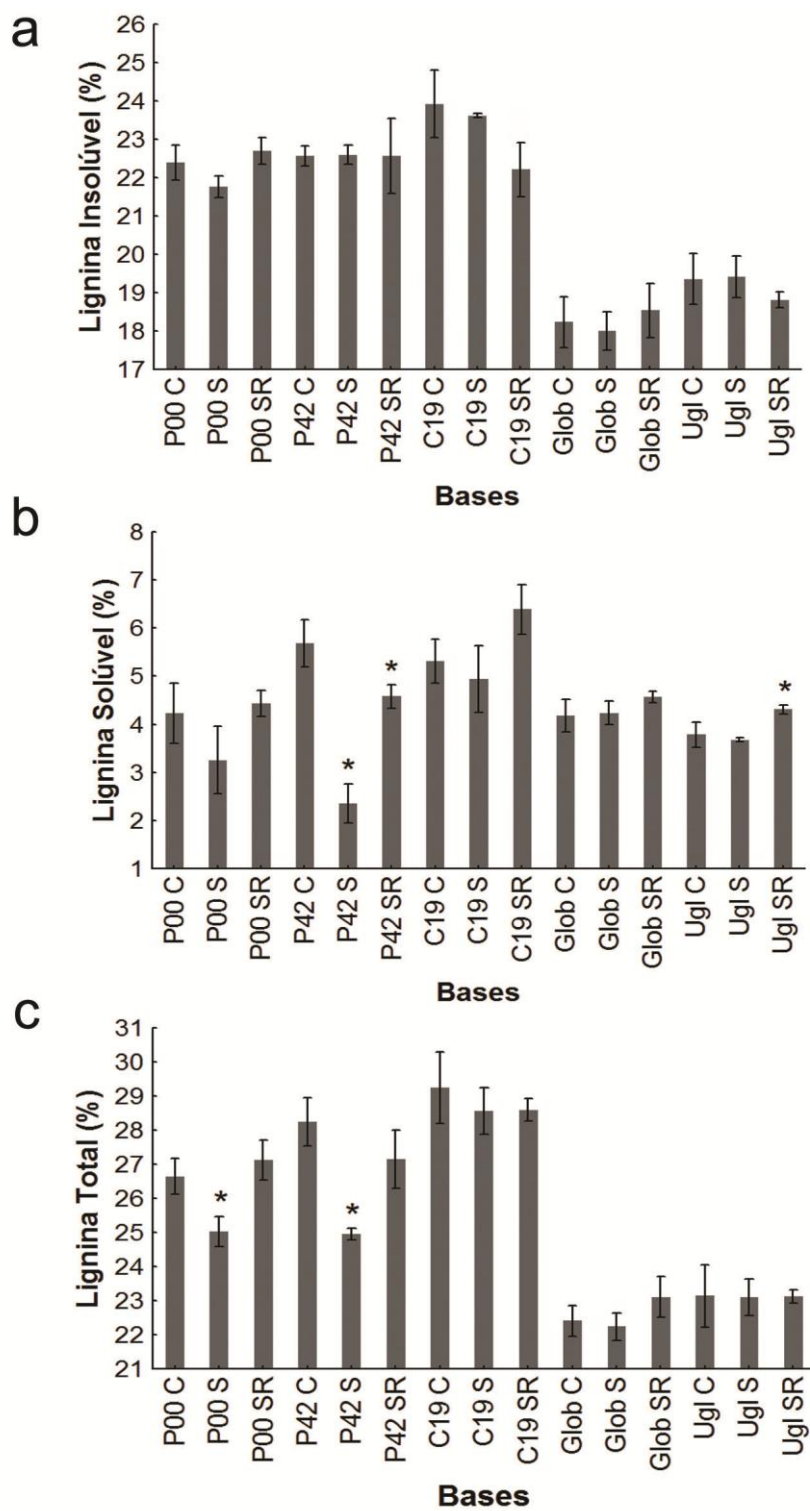


Figura 16. Dosagem de lignina pelo método Klason em bases caulinares (a-c) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR), ou em plantas controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

Finalmente, em *E. globulus*, os resultados de aumento de lignina anteriormente indicados pela dosagem pelo método do ácido tioglicólico no ápice das plantas que foram expostas à seca não foi observado nas dosagens de lignina realizadas pelo método Klason (Fig. 15). Adicionalmente, a dosagem pelo método Klason indicou que a quantidade de lignina total diminuiu nos ápices do grupo seca recuperada (Fig. 15c). No experimento de frio (Figs. 13-14), foram observados aumentos da quantidade de lignina, tanto em ápices quanto em bases caulinares, e isto ocorreu para todas as frações de lignina nos ápices (Fig. 13, a-c) e para a fração insolúvel nas bases (Figs. 14, a,c).

Assim, em *E. globulus*, podemos concluir que o estresse de seca conduziu ao aumento da quantidade de lignina dosada pelo método do ácido tioglicólico em ápices caulinares. Adicionalmente, os resultados das análises pelo método Klason indicaram que, nos ápices desta espécie, pode ter ocorrido diminuição no teor de lignina no grupo seca recuperada, pois embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas frações solúvel e insolúvel, os resultados de lignina total indicaram redução significativa na quantidade de lignina total nos ápices do grupo seca recuperada. Em *E. globulus* no estresse de frio ocorreu aumento da lignificação tanto em ápices quanto em bases caulinares, sendo que, nas bases, a fração de lignina que foi aumentada correspondeu à fração insolúvel e total e, nos ápices, isto correspondeu a ambas as frações solúvel, insolúvel e total.

5.2.3. GC-MS

A composição monomérica do polímero da lignina foi avaliada por GC-MS a partir de lignina extraída por tioacidólise. Este método extrai a lignina degradando-a por quebra seletiva das ligações β -O-4, permitindo a quantificação específica dos monômeros de lignina

envolvidos nestas ligações, ou seja, permite a quantificação dos monômeros incorporados no polímero de lignina via ligações β -O-4.

Semelhante ao ocorrido com a dosagem de lignina pelo método do ácido tioglicólico, em bases não foram observadas alterações significativas na composição monomérica de siringil (S) e guaiacil (G) da lignina, bem como na proporção siringil/guaiacil (S/G) em nenhum dos experimentos de frio ou seca realizados (Figs. 17 e 18, d-f). Portanto, as alterações observadas se limitaram aos ápices (Figs. 17 e 18, a-c) e embora restritas, foram, na maioria das vezes, consistentes com os demais resultados obtidos com os métodos de dosagem de lignina.

Não foram observados derivados do *p*-hidroxifenil (H) nos produtos da tioacidólise nos eucaliptos estudados. A ausência destes produtos já foi relatada anteriormente em amostras de *E. globulus* (Evtuguin *et al.*, 2001; Guerra e Elissetche, 2008) e pode ser atribuído aos baixos rendimentos do tipo H na tioacidólise (Rolando *et al.*, 1992).

Foi observado em *E. urograndis* P00, redução da proporção S/G nos ápices no frio (Fig. 17c), o que sugere que tenha ocorrido alterações na quantidade individual de G ou S. Os resultados de dosagem de lignina, pelo método do ácido tioglicólico, indicaram que os ápices de P00 expostos a frio apresentam redução da lignina (Fig. 11 a). Para os ápices de P42 e C19 no frio a fração de lignina reduzida correspondeu à solúvel (Fig. 13, b), que por sua vez é constituída majoritariamente por S (Yasuda *et al.*, 2001). Embora não podemos afirmar que em P00 esteja ocorrendo o mesmo do que foi observado em P42 e C19, ou seja, redução da quantidade de lignina solúvel, sabemos que menores conteúdos de lignina Klason solúvel podem estar associados com menores proporções S/G determinadas por tioacidólise, embora isto não seja uma regra (Kishimoto *et al.*, 2010).

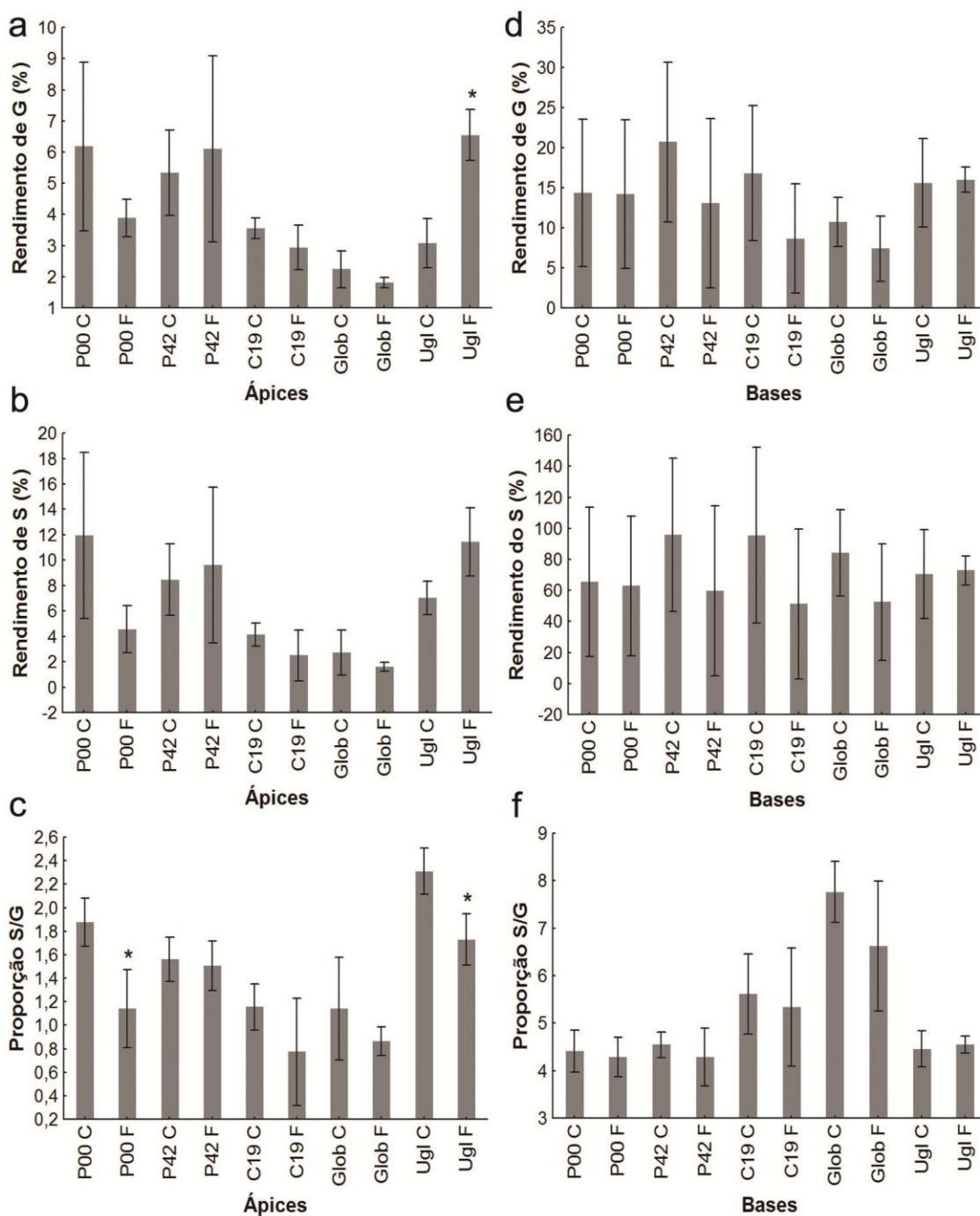


Figura 17. Rendimento dos monômeros guaiacil (G) e siringil (S) da lignina (a-b, d-e) e proporção S/G (c, f), determinados por tioacidólise seguida de análise em GC-MS em ápices (a-c) e bases caulinares (d-e) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a baixa temperatura (F) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

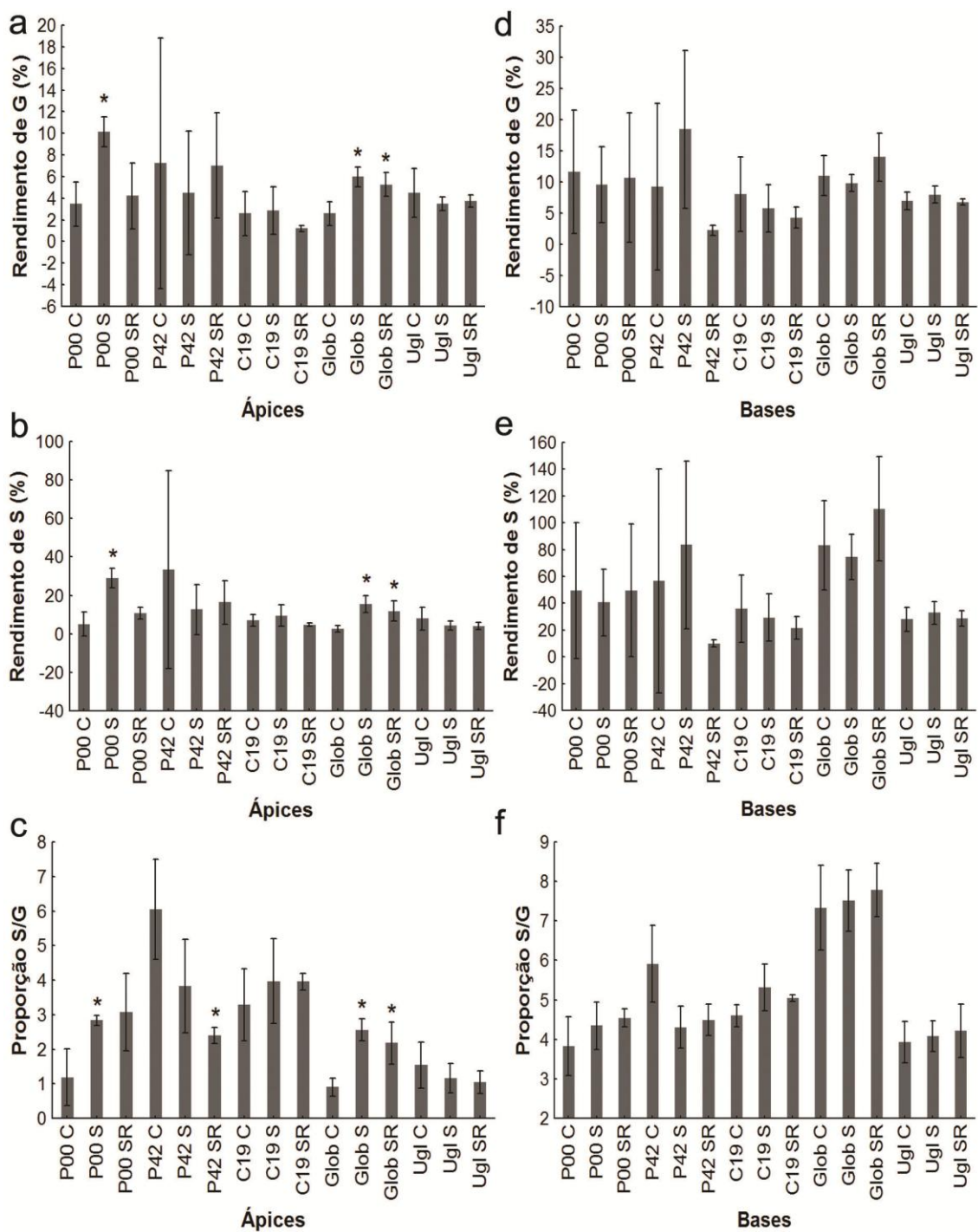


Figura 18. Rendimento dos monômeros guaiacol (G) e siringil (S) da lignina (a-b, d-e) e proporção S/G (c, f), determinados por tioacidólise seguida de análise em GC-MS em ápices (a-c) e bases caulinares (d-e) de *E. urograndis* (P00, P42, C19), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

Em ápices de P00 no tratamento de seca (Figs. 18, a-c), o teor de ambos monômeros G e S aumentou, mas o aumento da proporção S/G nos indica que o teor de S aumentou mais que G. Os resultados do método Klason indicaram que o teor de lignina solúvel diminuiu nos ápices de P00 no tratamento de seca (Fig. 15b). Isto correlaciona com resultados, já relatados na literatura, de análise por tioacidólise em plantas de faia (*Fagus crenata* Blume), os quais demonstraram que nem sempre um aumento da proporção S/G está associado com aumento da fração solúvel do Klason (Kishimoto *et al.*, 2010). Do mesmo modo, nos ápices de P42 no grupo seca recuperada, foi observada redução da proporção S/G (Fig. 18c) e aumento da lignina solúvel e redução da insolúvel (Figs. 15, a-b), demonstrando novamente que a lignina solúvel Klason nem sempre é positivamente relacionada com a proporção S/G. Plantas de *Populus* com supressão de COMT apresentam alteração no rendimento de monômeros S e G com ligações β -O-4 sem apresentar alterações na quantidade de lignina Klason (Lapierre *et al.*, 1999). De modo inverso, a supressão de CAD causa reduções na lignina Klason, mas não altera a frequência de S e G em β -O-4 (Lapierre *et al.*, 1999). Xie (2004) demonstrou que *E. globulus* possui mais unidades S, maior proporção S/G (determinada pelo método de nitrobenzeno), menos estruturas condensadas e mais aldeídos fenólicos que o *E. viminalis*, entretanto a lignina Klason é similar entre eles, demonstrando que alterações na proporção S/G podem ser observadas independentemente de flutuações nos valores das frações de lignina Klason.

Além disso, cabe ressaltar, e isto vale para todas as espécies de eucaliptos aqui analisadas, que o método da tioacidólise, que foi utilizado para se determinar a quantidade de G e S e a proporção S/G, abrange apenas a porção não condensada da lignina, ou seja, os monômeros ligados através de ligações β -O-4 (Yahiaoui *et al.*, 1998; Kishimoto *et al.*, 2010), o que corresponde a cerca de 50% da quantidade de lignina total (Lapierre *et al.*, 1999), e

embora a ligação β -O-4 seja o tipo de ligação predominante em condições normais para uma série de espécies (Marita *et al.*, 1999; Rencoret *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012), fazendo da tioacidólise um bom método analítico, o mesmo pode subestimar a quantidade total de G e S, podendo alterar o valor real de S/G por não considerar a fração destes monômeros ligados de forma condensada (fenilcumaranas, resinóis, bifenil etc). Isto pode ser mais grave quando, em determinadas condições experimentais, a ligação β -O-4 deixa de ser o tipo mais frequente na estrutura da lignina. Sabemos que a incorporação de coniferaldeído durante o processo de dimerização *in vitro* (*horseradish* peroxidase/ H_2O_2) do álcool coniferílico, altera a frequência geralmente encontrada de β -O-4 nos dímeros formados, bem como a frequência de outros tipos de ligações (Ito *et al.*, 2002). Assim, é possível que a incorporação de outras estruturas na lignina, bem como o efeito de diferentes condições experimentais possam mudar a frequência dos tipos de ligações possíveis do polímero, e possa reduzir a frequência de ligações β -O-4, diminuindo a confiabilidade da extrapolação da proporção S/G (determinada por tioacidólise) para todo o polímero, resultando em falsas interpretações do efeito desta proporção nas propriedades da lignina (extratibilidade, solubilidade etc). Neste caso, deve ser levada também em consideração a presença de outras estruturas para se entender o efeito observado na solubilidade/extratibilidade das ligninas. Por exemplo, a supressão da expressão de CAD em *Populus* não alterou a frequência de S ou G em β -O-4 (determinados por tioacidólise), mas ocorreu aumento na solubilização e fragmentação da lignina durante a polpação Kraft que pode ser explicado devido a uma maior ocorrência de outras estruturas, siringaldeídos, diarilpropanos (β -1), e mais importante de grupos fenólicos livres nas ligninas (Lapierre *et al.*, 1999).

Nos ápices de *E. uroglobulus* no frio, foi observado aumento da quantidade de monômeros G e redução significativa da proporção S/G (Figs. 17, a,c). Neste caso, o aumento

significativo de G, não acompanhado de alterações no S, resultou em redução significativa da proporção S/G. Adicionalmente, o método Klason nos indicou aumento significativo da fração insolúvel de lignina (Fig. 13 a), o que é coerente com a proporção S/G tendo em vista que a fração de lignina Klason insolúvel é mais enriquecida com unidades G, que são menos reativas ao ácido sulfúrico do que as unidades S (Yasuda *et al.*, 2001). Em diversas espécies estudadas, maiores quantidades de lignina Klason insolúvel foram sempre correlacionadas com menores proporções S/G (Kishimoto *et al.*, 2010).

Nos ápices de *E. globulus*, na seca e seca recuperada, foram observados maiores teores de G, S e aumento na proporção S/G (Figs. 18, a-c). Novamente, assim como para P00 na seca, o aumento de S/G em *E. globulus* no ensaio de seca deveu-se a um maior aumento em S, visto que ambos G e S aumentaram. O aumento de G e S, principais unidades constituintes da lignina, pode ter contribuído no aumento observado da lignina dosada pelo método do ácido tioglicólico em ápices de *E. globulus* na seca (Fig. 12 a). Entretanto, a redução de lignina total determinada por Klason, observada nos ápices do grupo seca recuperada (Fig. 15c) provavelmente seja resultado de reduções em outros componentes da lignina, ou até mesmo destes mesmos componentes, mas ligados de forma condensada.

5.2.4. LC-MS

A análise no LC-MS nos deu mais informação a respeito do tipo de estruturas e ligações inter-monoméricas presentes nas ligninas das espécies de eucalipto estudadas sob diferentes condições experimentais (Figs. 19, a-f). Esta análise, conforme especificado em material e métodos avalia ligninas extraídas por método etanólico e, portanto, analisa ligninas solúveis. Para a análise no LC-MS foram utilizadas apenas a espécie *E. globulus* e os híbridos *E. urograndis* P42, e *E. uroglobulus*.

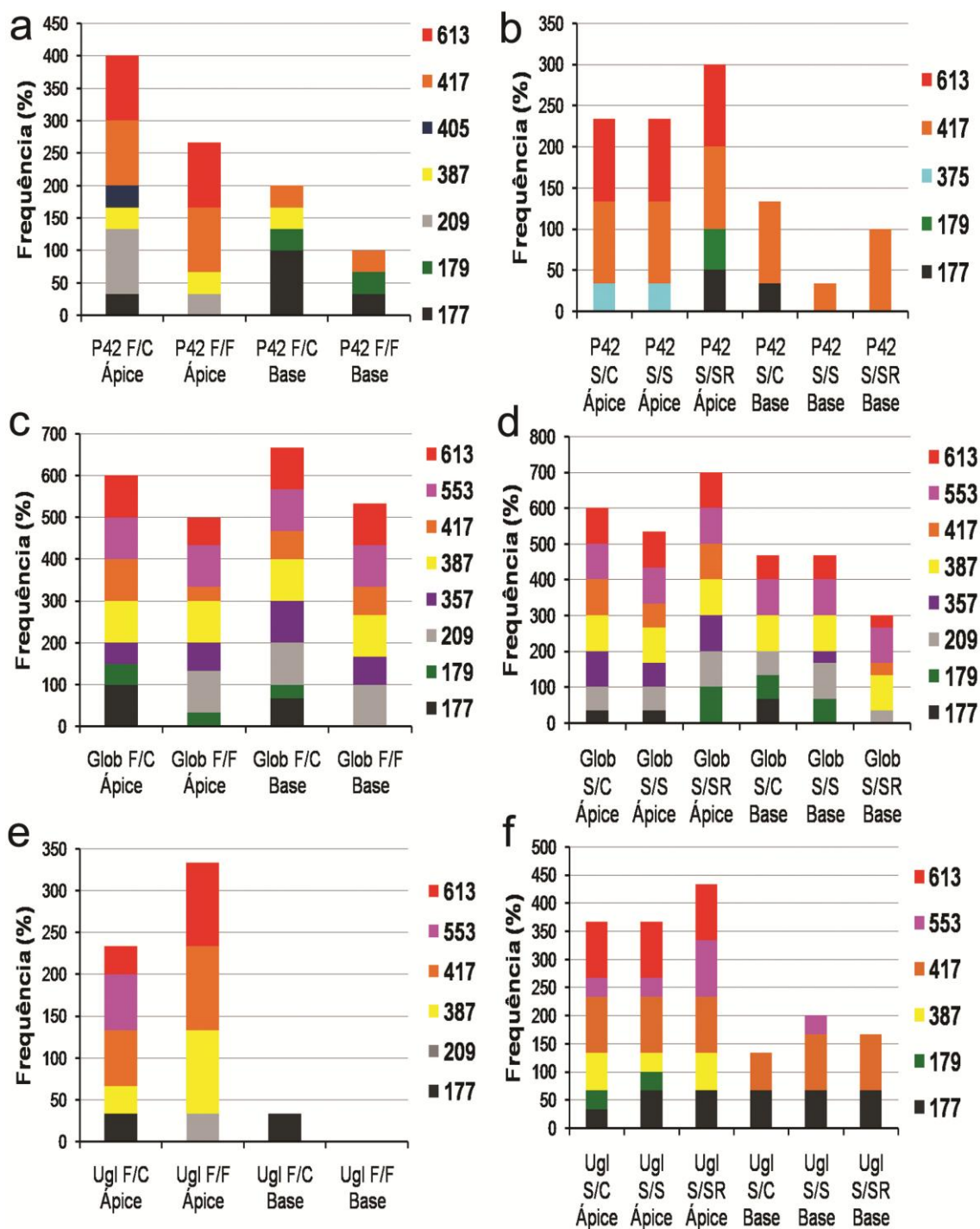


Figura 19. Frequência de ocorrência de determinada estrutura da lignina, identificada por LC-MS, no experimento de frio (a, c, e) e seca (b, d, f) em ápices e bases caulinares de *E. urograndis* P42, *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). (n = 2 ou 3). Estruturas: G(8-O-4)S(8-8)S ou S(8-O-4)S(8-5)G m/z 613, S(8-8)S m/z 417, G(8-O-4)S m/z 405, S(8-5)G ou S(8-8)G m/z 387, álcool sinapílico m/z 209, álcool coniferílico m/z 179, coniferaldeído m/z 177, G(8-O-4)G m/z 375, G(8-O-4)G(8-5)G m/z 553, G(8-8)G ou G(8-5)G m/z 357.

Foram encontradas estruturas de ligação pertencentes aos grupos β -aril éter (β -O-4), fenilcumaranas (β -5) e resinol (β - β) e foi possível identificar as respectivas unidades aromáticas G e S envolvidas em cada umas destas estruturas de ligação. Estes elementos (ligações e monômeros) foram encontrados constituindo-se dímeros ou trímeros. Além destas estruturas, foram encontrados também os alcoóis coniferílico e sinapílico e o aldeído coniferaldeído.

Dentre as estruturas encontradas nos extratos analisados no LC-MS, estão as denominadas β -aril éters, que são dímeros ligados através de 8-O-4' (Morreel *et al.*, 2010), também conhecidas como ligações β -O-4', pois envolvem a ligação do carbono 8, também denominado β da cadeia alifática de um fenilpropanóide. Estas estruturas se originam quando ocorre uma ligação envolvendo esta posição 8 de um monolignol com a posição O-4' de outro monolignol (Morreel *et al.*, 2010). Os dímeros β -aril éter foram encontrados apenas nos ápices de *E. urograndis* P42 em condições controle e no tratamento de seca (Figs. 19, a-b), e possuíam apenas monolignóis G-G ou G-S ligados formando dímeros com $m/z = 375$ e $m/z = 405$, respectivamente. Não foram encontradas benzodioxanos, que no caso seriam formados quando a posição 8 de um G ou de um S se liga a posição O-4' de um 5-hidroxi-guaiacil (5H) (Morreel *et al.*, 2010).

A ausência de dímeros β -aril éters (8-O-4' ligados) em ápices de *E. urograndis* P42 no frio e no grupo seca recuperada (Figs. 19, a-b) reflete o efeito dos tratamentos aplicados na formação desta estrutura. A ausência destes dímeros nas bases de *E. urograndis* P42 e também nas demais espécies de eucalipto estudados exemplifica o quanto diferente pode ser a composição química das ligninas em tecidos com diferentes graus de desenvolvimento secundário, no caso o ápice e a base caulinar analisada, e o quanto isto pode ser distinto também entre diferentes espécies. Além disso, o fato de não terem sido encontradas estas

estruturas (β -O-4) constituindo-se dímeros nas outras regiões e espécies, não significa que as mesmas não se encontrem constituindo-se oligômeros, em estruturas maiores já incorporadas no polímero em crescimento e que não puderam ser isoladas e identificadas utilizando-se a extração etanólica de lignina analisada no LC-MS. Álcoois, principalmente metanol e etanol são bons solventes neutros para a lignina, sendo altamente utilizados para se extrair lignina de materiais lignocelulósicos (Sun *et al.*, 2012). Ligninas extraídas com 70% de etanol à temperatura ambiente, praticamente não sofrem alteração estrutural (Xiao *et al.*, 2011), entretanto o rendimento destas ligninas costuma ser baixo (Xiao *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012), e as ligações β -O-4, assim como as ligações das ligninas com carboidratos não costumam ser quebradas, isolando ligninas com alto peso molecular (Xiao *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). A associação do método etanólico com reagentes alcalinos, tais como o NaOH, aumenta o rendimento e a liberação de dímeros e trímeros, promove a maior quebra de ligações β -O-4' (os principais alvos), e também de ligações com carboidratos, e resulta em liberação de lignina com menor peso molecular (Xiao *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012).

Outro tipo de ligação comum em dímeros de monolignóis desidrogenados é a ligação 8-5', a qual rende as estruturas de ligação do tipo fenilcumaranas (Morreel *et al.*, 2010). Foram encontrados nas amostras dos eucaliptos, dois dímeros ligados por 8-5, que foram as estruturas G(8-5)G com $m/z = 357$ e a estrutura S(8-5)G, $m/z = 387$. Estes dímeros foram mais frequentemente encontrados em *E. globulus* (Figs. 19, c-d), sendo que uma destas estruturas ($m/z = 357$) foi encontrada apenas nesta espécie, tanto em ápices quanto em bases. O dímero S(8-5)G, $m/z = 387$, também esteve localizado tanto em ápices quanto em bases de *E. globulus*, mas em *E. urograndis* P42 e *E. uroglobulus* o mesmo esteve preferencialmente localizado em ápices. Foi observado efeito dos tratamentos na frequência de ocorrências destas estruturas nas amostras analisadas. Em *E. uroglobulus* (Figs. 19, e-f), o dímero S(8-

5)G, $m/z=387$, foi mais frequente nas amostras submetidas ao estresse de frio e tem sua frequência reduzida nas amostras de plantas do grupo seca, retornando a frequências de ocorrências idênticas ao grupo controle no grupo “seca recuperada”. O outro efeito dos tratamentos foi observado na frequência de ocorrência do dímero G(8-5)G, $m/z=357$, nas amostras de *E. globulus* (Figs. 19, c-d), onde foi observado que o tratamento com frio aumentou a frequência de ocorrência desta estrutura nos ápices, mas a reduz nas bases nas mesmas condições. Estes efeitos são opostos nos ápices e bases expostos a seca, ou seja, reduz em ápices e aumenta nas bases. O padrão observado para o dímero S(8-5)G, $m/z = 387$, referente à recuperação de sua frequência de ocorrência no grupo “seca recuperada”, também é válido para o dímero G(8-5)G, $m/z = 357$.

O terceiro tipo de ligação que foi observada foi a 8-8', que é um dos tipos de ligações que ocorrem depois da dimerização inicial dos radicais monolignóis e constituem as estruturas denominadas resinóis (Morreel *et al.*, 2010). Ligações na posição 8 são altamente favoráveis, o que faz com que ligações 8-8' sejam o tipo de ligação predominante em misturas de dímeros desidrogenados, envolvendo principalmente o álcool sinapílico (Morreel *et al.*, 2010). Foram encontrados em nosso estudo três dímeros de resinóis, G(8-8)G com $m/z = 357$, S(8-8)G, $m/z = 387$ e S(8-8)S, $m/z = 417$. A estrutura G(8-8)G, $m/z = 357$, só foi encontrada em *E. globulus* (Figs. 19, c-d), tanto em ápices quanto em bases, e foi observado que o frio aumenta a frequência de ocorrência desta estrutura nos ápices, e reduz nas bases nas mesmas condições. Estes efeitos são opostos nos ápices e bases expostos à seca, ou seja, reduz em ápices e aumenta nas bases. O observado em pelo menos dois outros dímeros, relativo à recuperação da frequência de ocorrência dos mesmos no grupo “seca recuperada”, também é válido para o dímero G(8-8)G. O dímero S(8-8)G, $m/z = 387$, também esteve localizado tanto em ápices quanto em bases de *E. globulus*, mas em *E. urograndis* P42 e *E. uroglobulus* esteve

preferencialmente localizado em ápices. Em *E. uroglobulus* (Figs. 19, e-f), o dímero S(8-8)G, $m/z=387$, foi mais frequente nas amostras submetidas ao estresse de frio e tem sua frequência reduzida nas amostras de plantas do grupo seca, retornando a frequências idênticas ao grupo controle no grupo “seca recuperada”.

O terceiro e último dímero de resinol encontrado, S(8-8)S, $m/z = 417$ foi amplamente encontrado nos ápices e bases das espécies estudadas, estando ausente apenas nas bases de *E. uroglobulus* provenientes do experimento de frio. Com exceção de *E. uroglobulus* e das bases de *E. globulus* no ensaio de seca, em todas as outras situações em que ocorreram alterações na frequência deste dímero ($m/z = 417$), estas alterações consistiram de reduções de sua frequência na amostra que foi exposta ao estresse de frio ou seca.

Além dos dímeros citados, foram encontrados também trímeros de monolignóis, G(8-O-4)S(8-8)S e S(8-O-4)S(8-5)G com $m/z = 613$, e o trímero G(8-O-4)G(8-5)G, $m/z = 553$. Ambos trímeros foram mais frequentes em *E. globulus* (Figs. 19, c-d), sendo que em *E. urograndis* P42 não foi encontrado o trímero G-G-G, $m/z=553$. Além disso, os trímeros G-S-S ou S-S-G, ambos com $m/z = 613$, foram encontrados tanto em ápices quanto nas bases de *E. globulus* (Figs. 19, c-d), enquanto que nas outras espécies estes trímeros apresentaram-se restritos aos ápices (Figs. 19, a-b; e-f). O efeito dos tratamentos de frio ou seca na frequência destes trímeros foi observado apenas em *E. globulus* e *E. uroglobulus*. Os trímeros com $m/z = 613$ tiveram uma frequência menor nas amostras de ápices de *E. globulus* expostos a frio (Fig. 19c). Já em *E. uroglobulus* o efeito foi o inverso. Nos ensaios de seca, a única alteração observada correspondeu à menor frequência destes trímeros ($m/z = 613$) nas amostras de base de *E. globulus* do grupo “seca recuperada” (Fig. 19d). Quanto ao trímero G-G-G, $m/z=553$, as alterações observadas se restringiram a espécie *E. uroglobulus* e consistiram-se de aumento da frequência destas estruturas nos ápices e bases das plantas do grupo “seca recuperada” e seca,

respectivamente (Fig. 19f). Também nos ápices de *E. uroglobulus* expostos a frio foi observado redução da frequência de G-G-G (Fig. 19e).

Também foram encontrados coniferaldeído ($m/z = 177$), álcool coniferílico ($m/z = 179$) e álcool sinapílico ($m/z = 209$), e embora elas tenham sido encontradas em todas as espécies, é possível observar que o álcool sinapílico é mais frequente em *E. globulus* (Figs. 19, c-d) e o coniferaldeído é mais frequente nas amostras de *E. uroglobulus* (Figs. 19, e-f).

5.2.5. Digestibilidade da Celulose

Este procedimento descreve a sacarificação enzimática da celulose até glicose com o objetivo de determinar a extensão máxima possível de digestibilidade (Brown e Torget, 1996). Assim como para LC-MS, e pelos mesmos motivos mencionados, para o teste de digestibilidade foram utilizadas apenas a espécie *E. globulus* e os híbridos *E. urograndis* P42, e *E. uroglobulus*.

Foi constatado que a maioria das alterações observadas ocorreu em *E. urograndis* P42 e no experimento de seca (Fig. 20b). Em ápices de P42, foi observado aumento da digestibilidade no grupo seca recuperada (Fig. 20b). Neste mesmo grupo, foi observada redução da proporção S/G (Fig. 18c), apontando que uma maior quantidade de S provavelmente não foi o fator responsável pelo aumento da digestibilidade, e indicando que, na verdade, a sua redução possa estar relacionada com o aumento da digestibilidade. Apesar de que estudos com polimerização *in vitro* revelaram que a degradabilidade de polissacarídeos estruturais não é alterada com alterações na proporção das unidades H, G e S da lignina (Grabber *et al.*, 1997), e que estudos com biomassa não apontaram correlação significativa entre a eficiência de liberação de açúcar e a composição monomérica em *Medicago truncatula* (Chen e Dixon, 2007), estudos de digestibilidade em animais indicaram que reduções no

conteúdo de S podem ser correlacionados com aumento da degradabilidade (Fontaine *et al.*, 2003). Além disso, uma menor proporção S/G aumenta significativamente a liberação de xilose em hidrólise ácida de biomassa de *Populus* (Davison *et al.*, 2006) e plantas de sorgo com menor proporção S/G são mais facilmente hidrolisados após pré-tratamento (Corredor *et al.*, 2009). Em outro trabalho, Fu *et al.* (2011) observaram que a supressão de COMT em *Panicum virgatum* L. reduziu G e S, sendo que S reduziu mais do que o G, resultando em redução da proporção S/G e melhorias no rendimento de etanol, passando a requerer pré-tratamentos menos severos e menores doses de enzimas celulasas na etapa de sacarificação. Estes autores testaram tanto sacarificação quanto fermentação e ambos foram melhorados. As plantas transgênicas sem pré-tratamento também produziram mais etanol por grama de biomassa do que as plantas controle.

Ainda nos ápices de P42 no grupo seca recuperada, observamos que além da redução da proporção S/G (Fig. 18c), ocorreu aumento da quantidade de lignina solúvel e redução da lignina insolúvel (Figs. 15, a-b). Portanto, nos eucaliptos estudados, estes fatores também poderiam estar relacionados com o aumento da digestibilidade observada. Studer *et al.* (2011) sugeriram que fatores além da proporção S/G influenciam a recalcitrância à liberação de açúcar e apontam para uma necessidade urgente de compreendermos melhor a estrutura da parede celular para que as plantas possam ser racionalmente transformadas para redução de recalcitrância e produção eficiente de biocombustíveis. Assim, nos eucaliptos estudados, elementos além do G e S, presentes na lignina solúvel (por sua vez aumentada na dosagem Klason) ou na lignina insolúvel (por sua vez diminuída), poderiam estar contribuindo no aumento da digestibilidade em ápices de P42 no grupo seca recuperada. Ainda no ensaio de seca, em bases de P42 foram observadas reduções da quantidade de lignina solúvel nos grupos seca e seca recuperada (Fig. 16b) e reduções da digestibilidade (Fig. 20b) nestes mesmos

grupos. Assim, a quantidade de lignina solúvel nos *E. urograndis* P42 estudados pareceu estar positivamente relacionada com a digestibilidade da parede celular, ao contrário da proporção S/G que pareceu estar negativamente correlacionada. Wang *et al.*, (2012) demonstraram que em *Populus tomentosa* não há correlação entre a concentração de lignina insolúvel e a quantidades de açúcar liberado, entretanto a quantidade de lignina solúvel esteve negativamente correlacionada com a digestibilidade (aumentou a eficiência da hidrólise e a liberação de açúcar). Estes efeitos da lignina solúvel sob a digestibilidade em *Populus* são divergentes dos observados em nossas amostras de eucaliptos, entretanto estes efeitos podem estar relacionados com diferenças nos componentes fenólicos que constituem as respectivas frações de lignina solúvel em *Populus* e nos eucaliptos estudados. Componentes fenólicos constituintes das frações solúveis e insolúveis da lignina poderiam agir como inibitórios das enzimas hidrolíticas utilizadas (Berlin *et al.*, 2006; Chundawat *et al.*, 2007). Um dos componentes fenólicos estruturais que podem estar presentes nas frações da lignina é o coniferaldeído, que por sua vez pode alterar a solubilidade da lignina e a digestibilidade das paredes celulares (Higuchi *et al.*, 1994; Grabber *et al.*, 1998). Além disso, a frequência e os tipos de ligações presentes também são de caráter fundamental para o entendimento do comportamento das ligninas (Rencoret *et al.*, 2009).

Em *E. globulus*, observou-se um aumento significativo da digestibilidade da celulose das amostras de bases caulinares expostas à seca (Fig. 20b). Entretanto, para esta espécie não foram observadas alterações significativas de nenhuma fração de lignina analisada e também não foram observadas diferenças significativas na proporção S/G. No experimento de frio, a única alteração significativa de digestibilidade ocorreu em *E. urograndis* P42, onde foi observada redução da digestibilidade das bases no frio (Fig. 20a), mas também não foram observadas alterações significativas nas outras análises, impossibilitando comparações. Assim,

fatores além dos analisados poderiam estar relacionados com as alterações observadas na digestibilidade. Eudes (2012) observou que a redução da massa molecular da lignina, devido à redução do grau de sua polimerização, melhora a sacarificação de paredes celulares de tecidos caulinares pré-tratados de *Arabidopsis* mesmo sem alteração da quantidade de lignina solúvel, insolúvel ou total determinados por Klason.

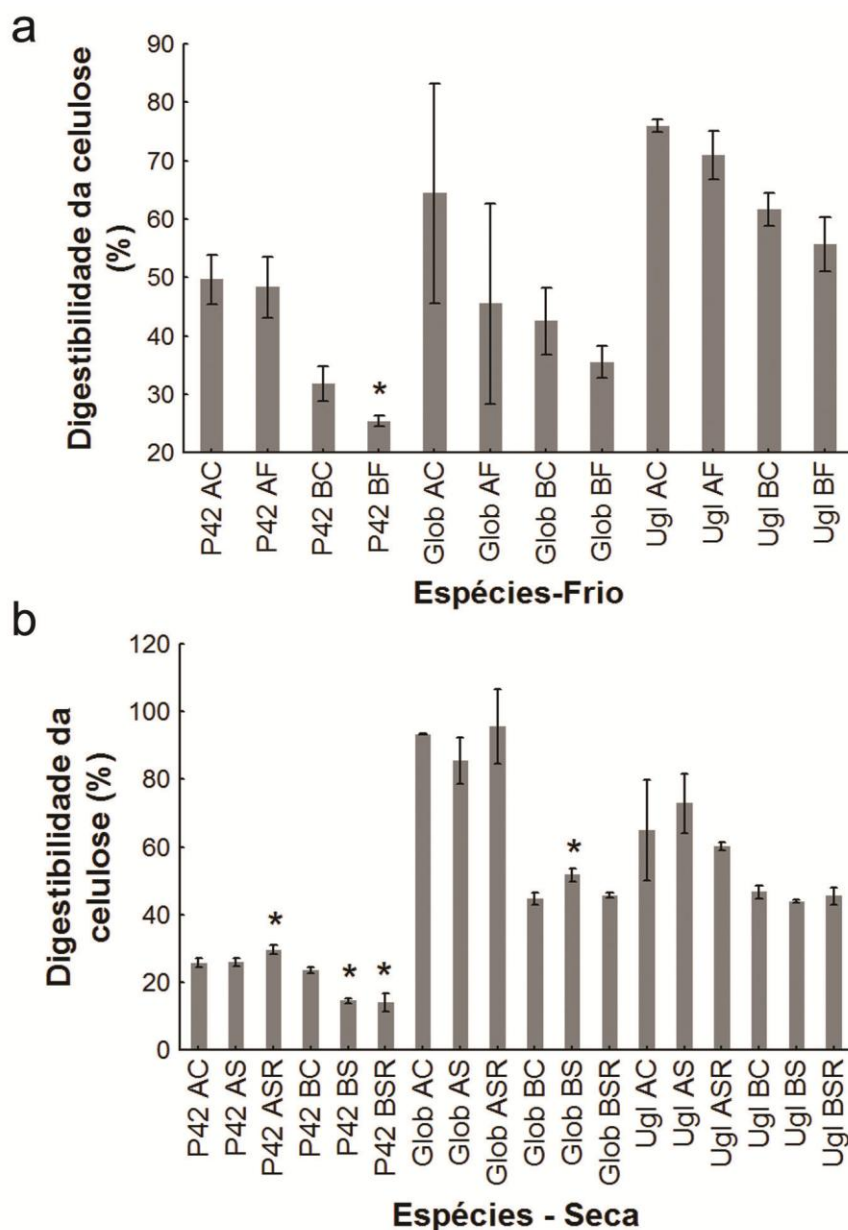


Figura 20. Digestibilidade da celulose no experimento de frio (a) e seca (b) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 (P42), *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio

(F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

Portanto, o estudo dos componentes estruturais além de S, G e S/G presentes, incluindo as estruturas de ligação, são fundamentais para a predição do comportamento das ligninas durante a polpação Kraft (Rencoret *et al.*, 2009), e úteis no entendimento da possível ação inibitória da lignina à hidrólise enzimática dos polissacarídeos da parede celular durante a produção de biocombustíveis, como vem sendo demonstrado (Bunzel *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011).

5.2.6. Análise Integrada dos Resultados Bioquímicos

Cabe aqui fazer mais algumas comparações dos resultados obtidos, incluindo agora os dados de LC-MS, para que assim possamos chegar a algumas conclusões quanto às modificações que ocorreram na lignina das diferentes espécies de eucaliptos, modificações estas que acreditamos terem sido promovidas pelos tratamentos de frio ou seca utilizados. Após isto, poderemos dar início à visualização molecular, indicando genes que acreditamos estarem envolvidos nestas alterações observadas, com ênfase nas alterações que podem ser benéficas do ponto de vista da produção do papel. As comparações descritas neste item poderão ser acompanhadas pelas Figs. 21-28, as quais contem esquemas com os resultados encontrados para cada espécie.

Para *E. urograndis* P42 (Fig. 21), os resultados são bastante coerentes, e quando agrupados evidenciam o que ocorreu com a lignina de P42 quando as plantas foram expostas as baixas temperaturas e seca. Embora os outros dois clones de *E. urograndis* (P00 e C19) não tenham sido utilizados nas análises de LC-MS e digestibilidade da celulose, os resultados bioquímicos encontrados para estes dois híbridos encontra-se nas Figs. 22 e 23.

| | Amostras de <i>E. urograndis</i> P42 | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| Análises | AF/C | AF/F | BF/C | BF/F | AS/C | AS/S | AS/SR | BS/C | BS/S | BS/SR |
| Tioglicólico | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Klason Solúvel | | ↓ | | — | | — | ↑ | | ↓ | ↓ |
| Klason Insolúvel | | — | | — | | — | ↓ | | — | — |
| Klason Total | | — | | — | | — | — | | ↓ | — |
| Siringil (S) | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Guaiacil (G) | | — | | — | | — | — | | — | — |
| S/G | | — | | — | | — | ↓ | | — | — |
| Digestibilidade | | — | | ↓ | | — | ↑ | | ↓ | ↓ |
| Coniferaldeído | | ↓ | | ↓ | | — | ↑ | | ↓ | ↓ |
| Álcool coniferílico | | — | | — | | — | ↑ | | — | — |
| Álcool sinapílico | | ↓ | | — | | — | — | | — | — |
| G(β-O-4)G | | — | | — | | — | ↓ | | — | — |
| GSS | | — | | — | | — | — | | — | — |
| S(8-8)S | | — | | — | | — | — | | ↓ | — |
| G(β-O-4)S | | ↓ | | — | | — | — | | — | — |
| SG em (8-8) e (8-5) | | — | | ↓ | | — | — | | — | — |

Figura 21. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. urograndis* P42, nos ensaios de frio e seca. Barras horizontais indicam ausência de diferenças significativas com relação ao controle. Setas para cima indicam aumento significativo, e setas para baixo indicam redução significativa, ambos com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AF/C**: ápices controle do ensaio de frio; **AF/F**: ápices expostos a frio; **BF/C**: bases controle do ensaio de frio; **BF/F**: bases expostas a frio; **AS/C**: ápices controle do ensaio de seca; **AS/S**: ápices de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **AS/SR**: ápices de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada); **BS/C**: bases controle do ensaio de seca; **BS/S**: bases de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **BS/SR**: bases de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada); **S/G**: proporção siringil/guaiacil; **S(8-8)S** e **SG em (8-8) e (8-5)** representam ligações condensadas.

| | Amostras de <i>E. urograndis</i> P00 | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| Análise | AF/C | AF/F | BF/C | BF/F | AS/C | AS/S | AS/SR | BS/C | BS/S | BS/SR |
| Tioglicólico | | ↓ | | — | | — | ↓ | | — | — |
| Klason Solúvel | | — | | — | | ↓ | ↑ | | — | — |
| Klason Insolúvel | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Klason Total | | — | | — | | — | ↑ | | ↓ | — |
| Siringil (S) | | — | | — | | ↑ | — | | — | — |
| Guaiacil (G) | | — | | — | | ↑ | — | | — | — |
| S/G | | ↓ | | — | | ↑ | — | | — | — |

Figura 22. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. urograndis* P00, nos ensaios de frio e seca. Barras horizontais indicam ausência de diferenças significativas com relação ao controle. Setas para cima indicam aumento significativo, e setas para baixo indicam redução significativa, ambos com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AF/C**: ápices controle do ensaio de frio; **AF/F**: ápices expostos a frio; **BF/C**: bases controle do ensaio de frio; **BF/F**: bases expostas a frio; **AS/C**: ápices controle do ensaio de seca; **AS/S**: ápices de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **AS/SR**: ápices de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada); **BS/C**: bases controle do ensaio de seca; **BS/S**: bases de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **BS/SR**: bases de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada).

Olhando para as estruturas das ligninas solúveis que foram identificadas pelo LC-MS nos ápices de *E. urograndis* P42 no frio (Fig. 21), observamos que três delas apresentam-se ausentes ou com frequência reduzida em relação ao controle, o que poderia ser um indicativo de redução da quantidade de lignina para esta espécie no frio. De fato, também observamos nos ápice de *E. urograndis* P42 no frio, redução da quantidade de lignina solúvel determinada por Klason, e acreditamos que de algum modo esta redução possa ter sido ocasionada pelas alterações observadas nas estruturas. Além disso, a alteração nestas estruturas poderia levar a alterações na digestibilidade, mas isto não foi observado nestas regiões, conforme será explicado posteriormente.

Nos ápices de P42 no frio observamos a ausência do dímero β -aril éter G(8-O-4)S, m/z = 405. A redução de ligações β -O-4, poderia estar restringindo o crescimento do polímero via ligações β -O-4 em favor de ligações intermonoméricas condensadas. Em *Pinus radiata* a supressão de 4CL reduz ligações condensadas fenilcumaranas e resinóis, em contrapartida há o aumento de ligações β -aril éters (unidades β -O-4) (Wagner *et al.*, 2009). Plantas com supressão de C3H e HCT apresentam uma maior quantidade de ligações fenilcumaranas e resinóis, e a quantidade de ligações β -O-4 são reduzidas (Ralph *et al.*, 2006; Pu *et al.*, 2009; Ziebell *et al.*, 2010). Assim, a redução das ligações β -O-4 em eucalipto poderia estar resultando em aumento de ligações intermonoméricas condensadas. A redução de ligações β -O-4 em *Medicago sativa*, aumentou a ocorrência de ligações condensadas do tipo fenilcumaranas e resinóis e diminuiu a extensão e massa molecular das ligninas (Ziebell *et al.*, 2010). Assim, a redução de ligações β -O-4 em ápices de P42 no frio também poderia estar resultando em menor extensão da lignina e menor massa molecular. Sabe-se que redução da massa molecular da lignina pode reduzir a sua estabilidade térmica (Sun *et al.*, 2010), aumentar a sua extratabilidade (Ziebell *et al.*, 2010) e melhorar a digestibilidade da parede celular (Eudes 2012). Não observamos alteração na digestibilidade das amostras de ápices de P42 no frio. Além disso, observamos redução do conteúdo de lignina solúvel, o que poderia ser explicado olhando-se as demais estruturas alteradas nesta amostra.

A segunda estrutura que foi reduzida nos ápices de P42 no frio foi o álcool sinapílico (m/z = 209) e, portanto, poderíamos supor que ocorreu redução da incorporação de unidades S da lignina, o que de fato foi observado no LCMS (redução de dímero GS em β -O-4). A redução de S poderia resultar em redução da lignina solúvel, visto que a fração solúvel do Klason é a mais enriquecida com estas unidades (Yasuda *et al.*, 2001). Entretanto, nas demais

amostras onde a redução do álcool sinapílico não foi observada, observamos redução da quantidade de lignina solúvel determinada pelo método Klason.

| | Amostras de <i>E. urograndis</i> C19 | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| Análise | AF/C | AF/F | BF/C | BF/F | AS/C | AS/S | AS/SR | BS/C | BS/S | BS/SR |
| Tioglicólico | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Klason Solúvel | | ↓ | | — | | — | — | | — | — |
| Klason Insolúvel | | — | | ↑ | | — | — | | — | — |
| Klason Total | | ↓ | | ↑ | | — | — | | — | — |
| Siringil (S) | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Guaiacil (G) | | — | | — | | — | — | | — | — |
| S/G | | — | | — | | — | — | | — | — |

Figura 23. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. urograndis* C19, nos ensaios de frio e seca. Barras horizontais indicam ausência de diferenças significativas com relação ao controle. Setas para cima indicam aumento significativo, e setas para baixo indicam redução significativa, ambos com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AF/C**: ápices controle do ensaio de frio; **AF/F**: ápices expostos a frio; **BF/C**: bases controle do ensaio de frio; **BF/F**: bases expostas a frio; **AS/C**: ápices controle do ensaio de seca; **AS/S**: ápices de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **AS/SR**: ápices de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada); **BS/C**: bases controle do ensaio de seca; **BS/S**: bases de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **BS/SR**: bases de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada)

A participação do siringil na determinação da digestibilidade é um pouco incerta. Alguns trabalhos indicam que o siringil possa estar relacionado com a digestibilidade (Li *et al.*, 2010), mas diversos outros o apresentam como sendo negativamente correlacionado (Fontaine *et al.*, 2003; Davison *et al.*, 2006; Corredor *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2011) . Entretanto, não observamos alteração na digestibilidade nas amostras de ápices de P42 no frio, o que está

de acordo com outros trabalhos que não apontam nenhuma relação entre variação na composição monomérica e digestibilidade (Grabber *et al.*, 1997; Chen e Dixon, 2007).

A terceira estrutura que foi reduzida nos ápices de P42 no frio foi o coniferaldeído. Este aldeído é reduzido pela enzima CAD em seu respectivo álcool coniferílico (Möller *et al.*, 2005), mas também é um dos principais substratos da F5H, também denominada de coniferaldeído 5-hidroxilase (CAld5H), uma enzima que desvia intermediários do álcool coniferílico para a produção de álcool sinapílico (Marita *et al.*, 1999). Assim, a redução de coniferaldeído nos ápices de P42 no frio poderia estar interferindo tanto na síntese de álcool coniferílico quanto álcool sinapílico, embora a maior alteração de um ou de outro seja dependente do Km de CAD e F5H em cada espécie (Xu *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que o coniferaldeído também pode ser naturalmente incorporado no polímero de lignina (Gómez-Ros *et al.*, 2007), e principalmente em plantas transgênicas com supressão da expressão de CAD (Higuchi *et al.*, 1994; Yahiaoui *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 2001) e de COMT (Tsai *et al.*, 1998). A polimerização da lignina com coniferaldeído e álcool coniferílico em um sistema modelo de parede primária de milho utilizando peroxidase e H₂O₂ exógeno, demonstrou que ligninas enriquecidas com coniferaldeído podem proporcionar uma maior solubilidade das ligninas em meio alcalino, facilitando a deslignificação de plantas durante a produção de papel, mas também podem ser inibitórias à degradação da parede celular (hidrólise enzimática), reduzindo a liberação de açúcar (Grabber *et al.*, 1998). Esta maior extratabilidade das ligninas enriquecidas com coniferaldeído é devido ao fato de que o mesmo não é propenso a formar ligações com outros constituintes da parede celular (proteínas, e polissacarídeos estruturais) via intermediários quinona metídeos formados durante o acoplamento β -O-4 dos monolignóis. (Grabber *et al.*, 1998).

Assim, a redução de coniferaldeído, além de poder estar interferindo na produção individual de álcool sinapílico e álcool coniferílico, poderia também estar alterando a solubilidade e a digestibilidade da lignina nos ápices de P42 no frio.

A observação das respostas encontradas nas outras amostras de P42 (Fig. 24) nos indicou que o coniferaldeído pode estar diretamente relacionado com a solubilidade da lignina, com exceção da amostra P42 BF/F (possivelmente devido ao fato de que esta foi a única amostra onde a redução do coniferaldeído não foi bastante o suficiente para excluí-lo por completo da amostra). Para todas as demais amostras, sempre que há redução de coniferaldeído há redução de solubilidade e quando ocorre aumento de coniferaldeído a solubilidade também é aumentada. Além disso, observamos que reduções de siringil em ligações condensadas são acompanhadas de redução da solubilidade (P42 BS/S). Já reduções de G e S em ligações β -O-4 podem estar acompanhadas tanto de redução (P42 AF/F) quanto de aumento da solubilidade (P42 AS/SR).

Tentando entender como estas alterações nas estruturas de ligação poderiam estar associadas com as alterações observadas no coniferaldeído, e conseqüentemente no resultado final da solubilidade, foi montado um esquema na Fig. 24. Neste esquema é possível observar que na amostra P42 BS/S a redução de S em ligações condensadas poderia explicar a redução do coniferaldeído observada, através de redução do mesmo em ligação β -O-4. Já a redução de G e S em β -O-4 na amostra P42 AS/SR poderia explicar o aumento do coniferaldeído observado, através de aumento do mesmo em ligação β -O-4. Na amostra P42 AF/F, a redução de G e S em β -O-4 poderia explicar a redução do coniferaldeído, através de redução do mesmo em ligações condensadas.

O esquema da figura 24 foi montado de acordo com os resultados encontrados e com embasamento em trabalhos já publicados onde são demonstrados que a redução de ligações β -O-4 pode resultar em aumento da quantidade de ligações condensadas do tipo fenilcumaranas e resinóis (Ralph *et al.*, 2006; Pu *et al.*, 2009; Ziebell *et al.*, 2010) ou que a redução de ligações condensadas fenilcumaranas e resinóis são compensadas pelo aumento de ligações β -O-4 (Wagner *et al.*, 2009) sendo observado alterações na incorporação de coniferaldeído (Yahiaoui *et al.*, 1998; Lapiere *et al.*, 1999.), o qual poderia estar sendo incorporado nestes tipos de ligações em detrimento da incorporação dos monolignóis tradicionais. Além disso, Gomez-Ros *et al.* (2007) demonstram que a proporção entre álcool hidroxinamóil (monolignol)/hidroxicinamaldeído é bem conservada dentro das principais linhagens evolutivas, ou seja variações em álcool coniferílico são compensadas por variações em coniferaldeído, de modo que a proporção Álcool/Aldeído se mantém bem similar em linhagens filogeneticamente mais próximas. O mesmo é válido para o álcool sinapílico e sinapaldeído nas linhagens em que o sinapaldeído ocorre. Por exemplo, a relação álcool coniferílico/coniferaldeído é maior em angiospermas (em torno de 30) do que em gimnospermas (em torno de 10).

Na determinação da digestibilidade, a redução de coniferaldeído em β -O-4 também poderia estar associada com a redução da digestibilidade, assim como o aumento de coniferaldeído em β -O-4 também aumentaria a digestibilidade. Entretanto, a redução de coniferaldeído em ligações condensadas possivelmente não alteraria a digestibilidade (Fig. 24).

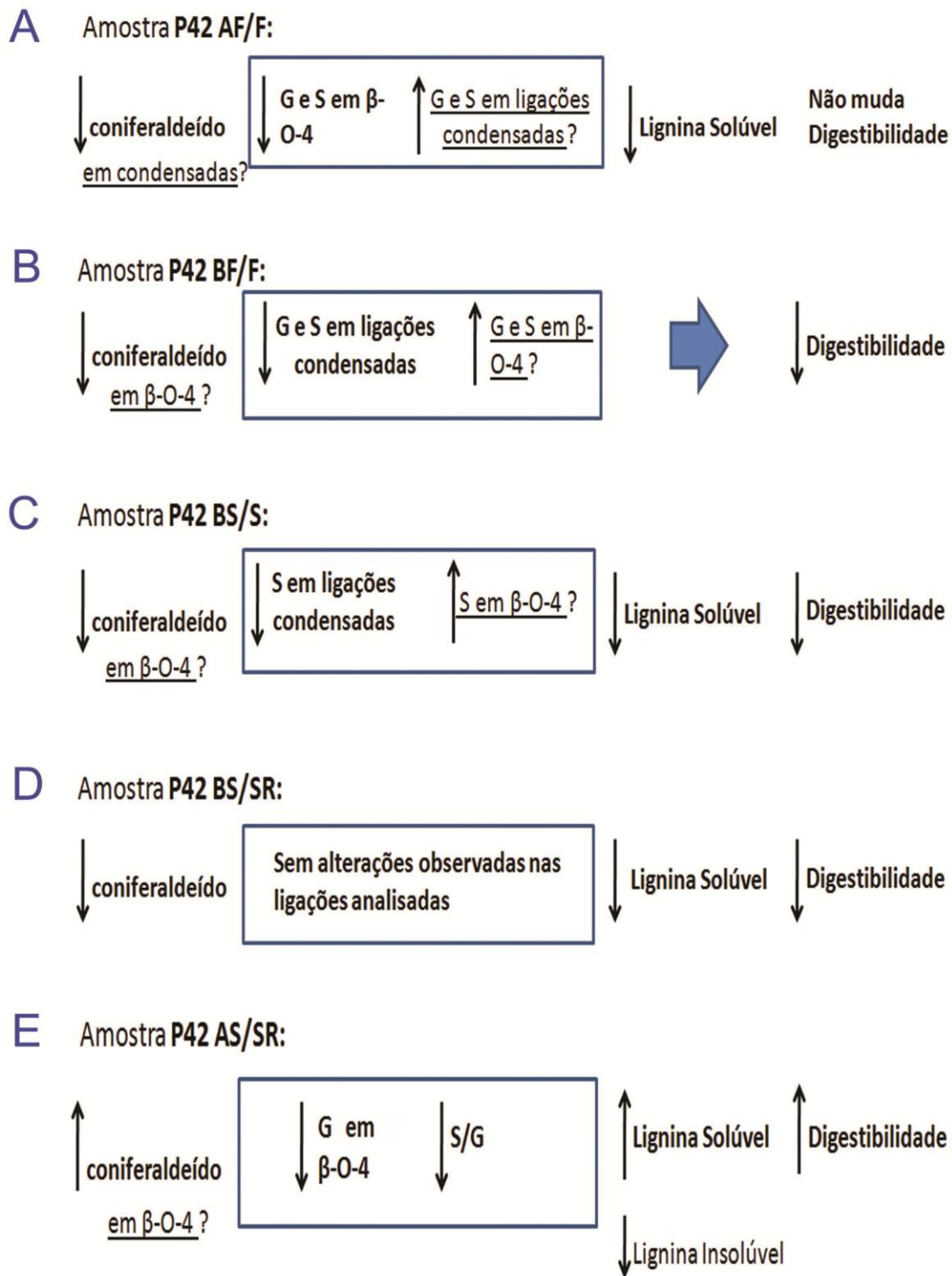


Figura 24 Esquema do padrão de respostas encontrado em *E. urograndis* P42 nos ensaios de frio e seca. **AF/F**: ápices submetidos a frio; **BF/F**: bases submetidas a frio; **BS/S**: bases submetidas a seca; **BS/SR**: bases do grupo seca recuperada; **AS/SR**: ápices do grupo seca recuperada.

Assim, em ápices de *E. urograndis* P42 no frio, assim como nas demais amostras analisadas, foi observado que, independentemente da real ocorrência de algumas das alterações contidas no esquema da Fig. 24, o coniferaldeído está positivamente relacionado com a solubilidade. O coniferaldeído também esteve, na maioria das vezes, positivamente relacionado com a digestibilidade.

Portanto, para *E. urograndis* P42, a amostra que possivelmente apresentou lignina com características desejáveis do ponto de vista da produção do papel seria a de ápice do grupo seca recuperada (P42 AS/SR), a qual apresentou aumento de coniferaldeído e de lignina solúvel e redução de lignina insolúvel, características potencialmente associadas com melhorias na polpação Kraft, conforme discutido em tópicos anteriores. Portanto na seção de visualização molecular, será dado destaque aos genes que tiveram a expressão alterada nesta amostra e que, portanto, poderiam estar relacionados com as alterações observadas.

Em *E. globulus* (Fig. 25), observamos uma série de alterações na frequência das estruturas encontradas nos ápices no frio e estas alterações indicam que a fração de lignina insolúvel poderia estar sendo mais aumentada do que a fração solúvel. De fato, pelo método Klason, foi observado aumento da lignina solúvel e insolúvel, sendo que este aumento foi maior na fração insolúvel (161 % de aumento na insolúvel e 125% na solúvel). Das estruturas, temos que a redução de resinóis S(8-8)S ($m/z = 417$), o aumento de fenilcumaranas e resinóis compostos apenas por GG ($m/z = 357$) e a redução do coniferaldeído ($m/z = 177$) poderiam estar relacionados com o aumento da insolubilidade da lignina, tendo em vista que a fração insolúvel do Klason é principalmente constituída de unidades G (Yasuda *et al.*, 2001), e que o coniferaldeído é positivamente correlacionado com uma maior solubilidade e extratibilidade (Grabber *et al.*, 1998). Em contrapartida, também foi observado aumento da frequência de álcool sinapílico em formas isoladas ($m/z = 209$), e este, se incorporado na lignina, poderia

estar aumentando (mesmo que em menor extensão) a fração de lignina solúvel, tendo em vista que o S pode ser um dos principais componentes da fração solúvel do Klason (Yasuda *et al.*, 2001).

Assim, nos ápices de *E. globulus* no frio ocorreu aumento tanto da fração solúvel quanto insolúvel de lignina, sendo que a fração insolúvel aumentou mais e poderia ser mais enriquecida com unidades G unidas por ligações condensadas (8-8 ou 8-5), com menor incorporação de coniferaldeído, o que por sua vez também poderia alterar a solubilidade da lignina.

Nas bases de *E. globulus* no frio (Fig. 25) foram observadas poucas alterações, e estas se resumiram em reduções na ocorrência de ligações G-G envolvendo resinóis (8-8) e fenilcumaras (8-5), redução de coniferaldeído e álcool coniferílico, e foi observado aumento da lignina insolúvel. Nestas bases a redução do coniferaldeído pode estar relacionada com o aumento da fração insolúvel, tendo em vista que o coniferaldeído é positivamente correlacionado com uma maior solubilidade e extratibilidade (Grabber *et al.*, 1998).

Nos ápices de *E. globulus* no experimento de seca (Fig. 25), foi observado redução de estruturas fenilcumaranas e resinóis constituídas de GG e de resinóis constituídos de SS no tratamento seca. Como discutido anteriormente, a redução de ligações condensadas na lignina poderia estar propiciando a formação de ligações β -aril éter (β -O-4) (Wagner *et al.*, 2009). A análise em GC-MS confirma esta suposição, pois indicou que ocorreu aumento das ligações β -O-4 envolvendo monômeros G e S (aumento principal de S, resultando em aumento de S/G). Além disso, a lignina que foi analisada no GC-MS foi extraída por tioacidólise, um método que permite quantificar os monômeros liberados a partir de quebra específica das ligações β -

O-4 (Kishimoto *et al.*, 2010). Este método nos indicou também que ocorreu aumento da proporção S/G, sendo que houve maior aumento de unidades S comparativamente a G.

Nos ápices de *E. globulus* do grupo “seca recuperada” (Fig. 25) observamos redução de lignina total determinada por Klason. Entretanto, foi observado aumento de G e S ligados em β -aril éter (aumento principal de S, resultando em aumento de S/G), o que indica que outro componente da lignina, além G ou S ligados em β -O-4 estariam sendo reduzidos. O coniferaldeído esteve ausente neste grupo. Assim, a redução do teor de coniferaldeído poderia estar relacionada com a redução da quantidade de lignina total, tendo em vista que o coniferaldeído também pode ser incorporado no polímero da lignina (Higuchi *et al.*, 1994; Yahiaoui *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 2001; Gómez-Ros *et al.*, 2007) .

Nas bases de *E. globulus*, no ensaio de seca (Fig. 25), foi observado aumento da digestibilidade da celulose no grupo seca. Foi observado aumento de álcool sinapílico nestas amostras, entretanto, como discutido anteriormente, o papel desempenhado pelo álcool sinapílico na determinação da digestibilidade é bem incerto. Alguns trabalhos indicam que o álcool sinapílico pode ser negativamente correlacionado com a digestibilidade (Fontaine *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2011), de modo que menores proporções S/G aumentam significativamente a liberação de xilose (Davison *et al.*, 2006) e a eficiência da hidrólise após pré-tratamento (Corredor *et al.*, 2009). Além disso, outros trabalhos não apontam nenhuma relação entre variação na composição monomérica e digestibilidade e eficiência de liberação de açúcar (Grabber *et al.*, 1997; Chen e Dixon, 2007).

Entretanto, também foi observado, nestas amostras de bases de *E. globulus* no ensaio de seca, aumento da frequência de ligações intermonoméricas condensadas GG e menor incorporação de coniferaldeído. Embora em *E. urograndis* P42 a redução de coniferaldeído

esteja sempre associada com redução de digestibilidade, sabe-se que em um sistema modelo de parede primária de milho não lignificada, a polimerização da lignina com coniferaldeído e álcool coniferílico utilizando-se peroxidase e H₂O₂ exógeno, demonstrou que ligninas enriquecidas com coniferaldeído podem ser mais inibitórias à degradação da parede celular (hidrólise enzimática) do que as ligninas formadas com álcool coniferílico, havendo uma menor liberação de açúcar (Grabber *et al.*, 1998). Entretanto, Grabber *et al.* (1998) recomendam ter certo grau de precaução com a extrapolação deste modelo para outras plantas, pois pode haver diferenças na composição da lignina e degradabilidade nas paredes celulares secundárias. De fato, esta inibição da digestibilidade causada pelo coniferaldeído não parece estar acontecendo em *E. urograndis* P42 (Figs. 21 e 24), embora em *E. globulus* isto pareça ser possível (Figs. 25), podendo ser então uma característica que varia entre as espécies. Portanto, ao contrário do que ocorre em *E. urograndis* P42, em *E. globulus* o coniferaldeído parece estar negativamente relacionado com a digestibilidade.

Um resumo do padrão de respostas encontrado em *E. globulus* encontra-se na Fig 26.

Podemos sumarizar que em *E. globulus* não obtivemos tantas alterações na quantidade de lignina solúvel tal como foram encontradas em *E. urograndis* P42. Na verdade, em *E. globulus* isto foi observado apenas na amostra de ápices no frio (AF/F) e consistiu de aumento da quantidade de lignina solúvel (Fig. 26 A), o que esteve negativamente correlacionado com a quantidade de coniferaldeído, o oposto ao encontrado em *E. urograndis* P42 (Fig. 24). Além disso, em *E. globulus* (Fig. 26) o coniferaldeído não é positivamente correlacionado com a digestibilidade, mas em P42, na maioria das vezes, é correlacionado.

| | Amostras de <i>E. globulus</i> | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| Análise | AF/C | AF/F | BF/C | BF/F | AS/C | AS/S | AS/SR | BS/C | BS/S | BS/SR |
| Tioglicólico | | — | | — | | ↑ | — | | — | — |
| Klason Solúvel | | ↑ | | — | | — | — | | — | — |
| Klason Insolúvel | | ↑ | | ↑ | | — | — | | — | — |
| Klason Total | | ↑ | | ↑ | | — | ↓ | | — | — |
| Siringil (S) | | — | | — | | ↑ | ↑ | | — | — |
| Guaiacil (G) | | — | | — | | ↑ | ↑ | | — | — |
| S/G | | — | | — | | ↑ | ↑ | | — | — |
| Digestibilidade | | — | | — | | — | — | | ↑ | — |
| Coniferaldeído | | ↓ | | ↓ | | — | ↓ | | ↓ | ↓ |
| Álcool coniferílico | | ↓ | | ↓ | | — | ↑ | | | ↓ |
| Álcool sinapílico | | ↑ | | — | | — | ↑ | | ↑ | ↓ |
| GG em (8-8) e (8-5) | | ↑ | | ↓ | | ↓ | — | | ↑ | — |
| GSS | | ↓ | | — | | — | — | | — | ↓ |
| S(8-8)S | | ↓ | | — | | ↓ | — | | — | ↑ |
| SG em (8-8) e (8-5) | | — | | — | | — | — | | — | — |
| GGG | | — | | — | | — | — | | — | — |

Figura 25. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. globulus*, nos ensaios de frio e seca. Barras horizontais indicam ausência de diferenças significativas com relação ao controle. Setas para cima indicam aumento significativo, e setas para baixo indicam redução significativa, ambos com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AF/C**: ápices controle do ensaio de frio; **AF/F**: ápices expostos a frio; **BF/C**: bases controle do ensaio de frio; **BF/F**: bases expostas a frio; **AS/C**: ápices controle do ensaio de seca; **AS/S**: ápices de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **AS/SR**: ápices de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada); **BS/C**: bases controle do ensaio de seca; **BS/S**: bases de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **BS/SR**: bases de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada). **GG em (8-8) e (8-5)**, **S(8-8)S** e **SG em (8-8) e (8-5)** representam ligações condensadas; **GSS** = G(8-O-4)S(8-8)S e S(8-O-4)S(8-5)G.

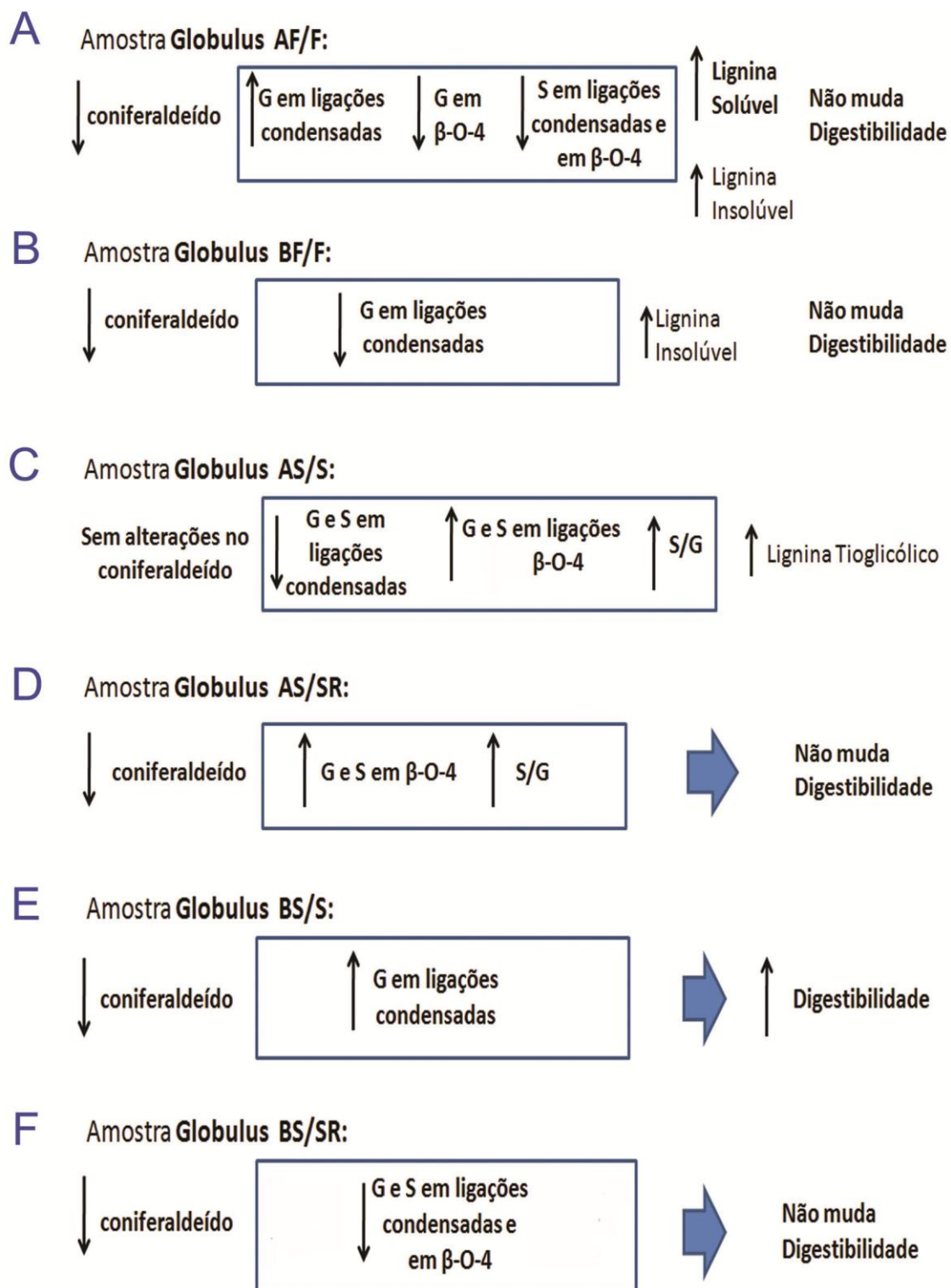


Fig. 26 Esquema do padrão de respostas encontrado em *E. globulus* nos ensaios de frio e seca. **AF/F**: ápices submetidos a frio; **BF/F**: bases submetidas a frio; **AS/SR**: ápices do grupo seca recuperada; **BS/S**: bases submetidas a seca; **BS/SR**: bases do grupo seca recuperada.

Portanto, para a espécie *E. globulus*, a amostra que possivelmente apresenta lignina com as características mais desejáveis do ponto de vista da produção do papel, seria a de ápices do grupo seca (AS/S) e seca recuperada (AS/SR), as quais apresentaram aumento da proporção S/G, devido aumento principal de S, e a amostra de ápice submetido a frio (AF/F) a qual apresentou aumento de lignina solúvel. Além disso, temos alterações que poderiam ser benéficas do ponto de vista do aproveitamento da celulose para a produção de biocombustível, embora não seja o caso do eucalipto. Esta amostra seria a de bases do tratamento seca (BS/S), onde foram observados redução de coniferaldeído e aumento de digestibilidade.

Em *E. uroglobulus* (Fig. 27) foi observado aumento de dímeros contendo unidades S nos ápices no frio, sendo observado redução de trímeros de GGG. Foi observado também aumento de álcool sinapílico ($m/z = 209$) e redução de coniferaldeído. Além disso, os resultados do GC-MS indicaram que a incorporação de unidades G em β -O-4 foi aumentada, de modo que a proporção S/G foi reduzida. Tendo em vista os efeitos já mencionados destas estruturas nas propriedades da lignina, as alterações na frequência destas estruturas poderiam ter alterado a solubilidade das ligninas, podendo ter contribuído no aumento observado da lignina insolúvel. Em bases de *E. uroglobulus*, no ensaio de frio, diminuiu o teor de coniferaldeído ($m/z = 177$), o que poderia estar relacionado com o aumento da quantidade de lignina solúvel e insolúvel no tratamento de frio.

Nos ápices de *E. uroglobulus*, do tratamento seca e seca recuperada, foi observado aumento do coniferaldeído, sendo que no grupo seca também foi observada redução de dímeros de fenilcumaranas e resinóis constituídos de SG, entretanto os demais resultados não foram significativos, o que impossibilitou comparações. Nas bases de *E. uroglobulus* no ensaio de seca, foi observado aumento de resinóis SS, tanto no grupo seca quanto no grupo seca recuperada, bem como aumento de lignina solúvel no grupo seca-recuperada.

Um esquema com alterações observadas em *E. uroglobulus* encontra-se na Fig. 28. Em síntese, observamos que em *E. uroglobulus* a simples alteração do coniferaldeído (sem alteração nas estruturas de ligação) é suficiente para se alterar a quantidade de lignina solúvel, assim como em *E. urograndis* P42. Entretanto, o coniferaldeído apresentou-se negativamente relacionado com quantidade de lignina solúvel, assim como em *E. globulus*. Portanto, em *E. uroglobulus* foram observados padrões de respostas que constituem-se de mosaicos de respostas encontradas em *E. urograndis* P42 e *E. globulus*, o que talvez seja naturalmente explicado pelo fato de *E. uroglobulus* ser um híbrido destas duas espécies. Com relação à quantidade de lignina insolúvel, nas três espécies, o coniferaldeído está negativamente relacionado. Em *E. globulus* e *E. uroglobulus* a quantidade de lignina insolúvel pode ser aumentada sem que para isso ocorra redução da fração solúvel, de modo que nestas duas espécies é possível observar aumento da lignina insolúvel acompanhado de aumento de lignina solúvel.

Portanto, para o híbrido denominado *E. uroglobulus*, as amostras que possivelmente apresentam lignina com as características mais desejáveis do ponto de vista da produção do papel seriam as de bases expostas a frio (BF/F) e bases do grupo seca recuperada (BS/SR), as quais apresentaram aumento de lignina solúvel, e a amostra de ápice do grupo seca recuperada (AS/SR) a qual apresenta redução de lignina dosada pelo método do ácido tioglicólico. Em *E. uroglobulus*, tanto a redução quanto o aumento de coniferaldeído podem estar associados com alterações benéficas para a produção do papel. Em *E. urograndis* estas alterações estão associadas com o aumento de coniferaldeído e em *E. globulus* com a redução.

| | Amostras de <i>E. uroglobulus</i> | | | | | | | | | |
|----------------------------|--|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| Análise | AF/C | AF/F | BF/C | BF/F | AS/C | AS/S | AS/SR | BS/C | BS/S | BS/SR |
| Tioglicólico | | — | | — | | — | ↓ | | — | — |
| Klason Solúvel | | — | | ↑ | | — | — | | — | ↑ |
| Klason Insolúvel | | ↑ | | ↑ | | — | — | | — | — |
| Klason Total | | ↑ | | ↑ | | — | — | | — | — |
| Siringil (S) | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Guaiacil (G) | | ↑ | | — | | — | — | | — | — |
| S/G | | ↓ | | — | | — | — | | — | — |
| Digestibilidade | | — | | — | | — | — | | — | — |
| Coniferaldeído | | ↓ | | ↓ | | ↑ | ↑ | | — | — |
| Álcool coniferílico | | — | | — | | — | ↓ | | — | — |
| Álcool sinapílico | | ↑ | | — | | — | — | | — | — |
| GSS | | ↑ | | — | | — | — | | — | — |
| S(8-8)S | | ↑ | | — | | — | — | | ↑ | ↑ |
| SG em (8-8) e (8-5) | | ↑ | | — | | ↓ | — | | — | — |
| GGG | | ↓ | | — | | — | ↑ | | ↑ | — |

Figura 27. Respostas bioquímicas encontradas nos ápices e bases de *E. uroglobulus*, nos ensaios de frio e seca. Barras horizontais indicam ausência de diferenças significativas com relação ao controle. Setas para cima indicam aumento significativo, e setas para baixo indicam redução significativa, ambos com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AF/C**: ápices controle do ensaio de frio; **AF/F**: ápices expostos a frio; **BF/C**: bases controle do ensaio de frio; **BF/F**: bases expostas a frio; **AS/C**: ápices controle do ensaio de seca; **AS/S**: ápices de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **AS/SR**: ápices de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada); **BS/C**: bases controle do ensaio de seca; **BS/S**: bases de plantas sob estresse hídrico (grupo seca); **BS/SR**: bases de plantas expostos ao estresse hídrico e reidratados (grupo seca recuperada). **S(8-8)S** e **SG em (8-8) e (8-5)** representam ligações condensadas; **GSS** = G(8-O-4)S(8-8)S e S(8-O-4)S(8-5)G; **GGG** = G(8-O-4)G(8-5)G.

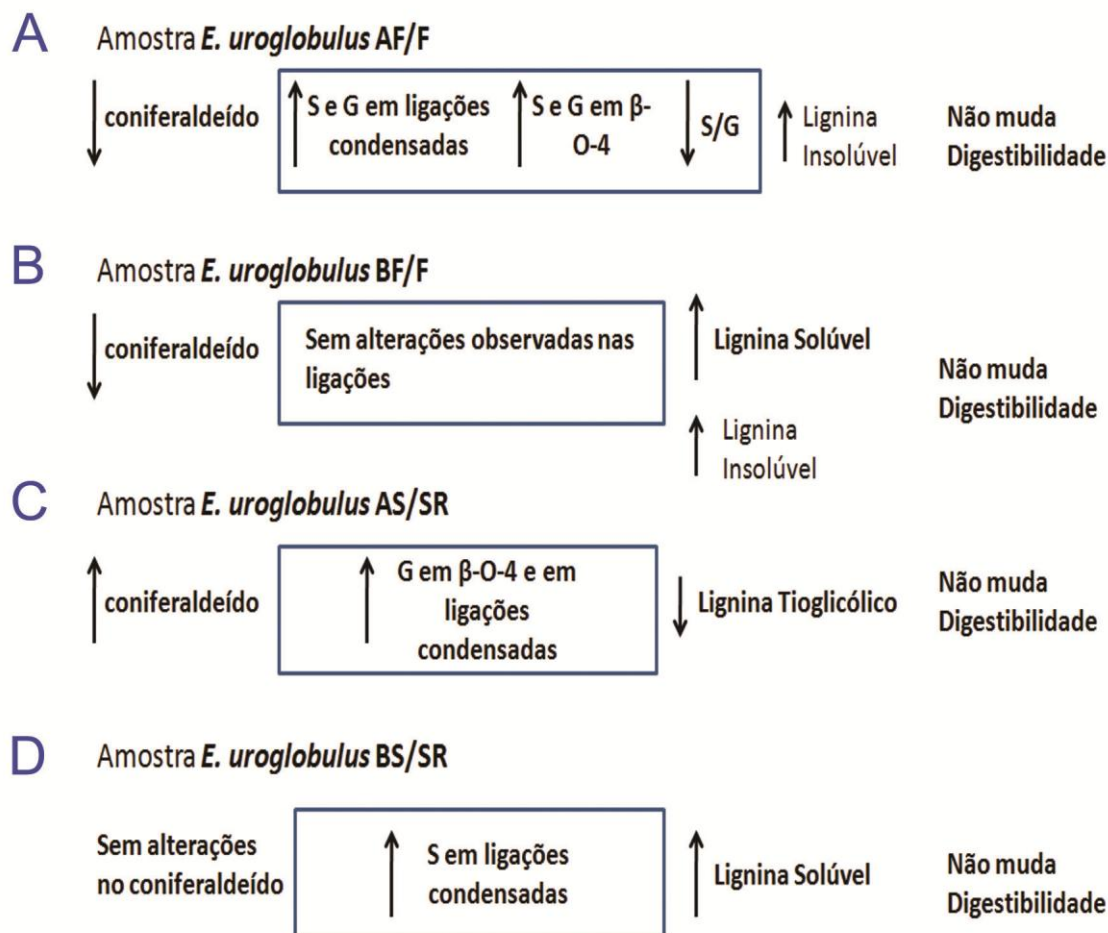


Fig. 28 Esquema do padrão de respostas encontrado em *E. urolobulus* nos ensaios de frio e seca. **AF/F**: ápices submetidos a frio; **BF/F**: bases submetidas a frio.

5.2.7. Qual foi o melhor estresse e região caulinar na geração de alterações bioquímicas benéficas do ponto de vista da produção do papel?

Observamos que o ensaio de seca foi melhor do que o ensaio de frio no sentido de proporcionar alterações bioquímicas benéficas nas amostras testadas. Do total de 7 amostras que consideramos apresentar características benéficas para a produção do papel, 5 delas são provenientes do ensaio de seca, destacando assim que para os objetivos deste trabalho, o ensaio de seca é mais indicado que o ensaio de frio. Além disso, deste total de 7 amostras que consideramos apresentar características benéficas para a produção do papel, 5 delas são

provenientes de ápices, destacando assim que para os objetivos deste trabalho, as regiões de ápices caulinares são mais indicadas.

5.3. Análise da Expressão Gênica

5.3.1. *E. urograndis* P42

Os resultados de expressão gênica em *E. urograndis* P42 encontram-se nas Figs. 29-33, e foram esquematizados na Fig. 34.

Nos ápices de *E. urograndis* P42 no frio, dos 6 genes alterados, apenas *POX2* teve a expressão aumentada no frio (Figs. 33d e 34), ao passo que os demais (*C4H1*, *LACA0*, *LACA5*, *LACA7* e *LACA8*) tiveram a expressão reduzida (Figs. 29b, 32 a-d e 34). Observamos nestas amostras de AF/F, redução de lignina solúvel, coniferaldeído e unidades G e S em ligações β -O-4 (Figs. 13 e 19). Nas bases no frio foi observado aumento da expressão de *CCoAOMT2* e *POX4* (Figs. 30, 33 e 34), e redução de coniferaldeído, digestibilidade e G e S em ligações condensadas (Figs. 19 e 20). Como não observamos nestas amostras alterações que pudessem ser benéficas do ponto de vista da produção do papel, iremos nos focar inicialmente nas expressões diferenciais que ocorreram no ensaio de seca, em que na amostra P42AS/SR foram encontradas características possivelmente adequadas a este propósito, após isto, comparações entre a amostra P42AS/SR e as demais amostras serão realizadas.

Nos ápices de *E. urograndis* P42 no ensaio de seca (P42AS/S), 10 genes tiveram a sua expressão reduzida no tratamento de seca: *PAL2*, *CCR0*, *COMT0*, *CAD2*, *LACA0*, *LACA8*, *LACA10*, *POX2*, *POX4* e *DIR10* (Figs. 29-34) Além disso, 8 genes tiveram a sua expressão aumentada: *HCT0*, *C3H0*, *CCoAOMT0*, *F5H0*, *F5H2*, *CAD5*, *CHIT0* e *POX8.1* (Figs. 29-31, 33 e 34) Não observamos nenhuma alteração quantitativa ou qualitativa na lignina analisada neste tratamento.

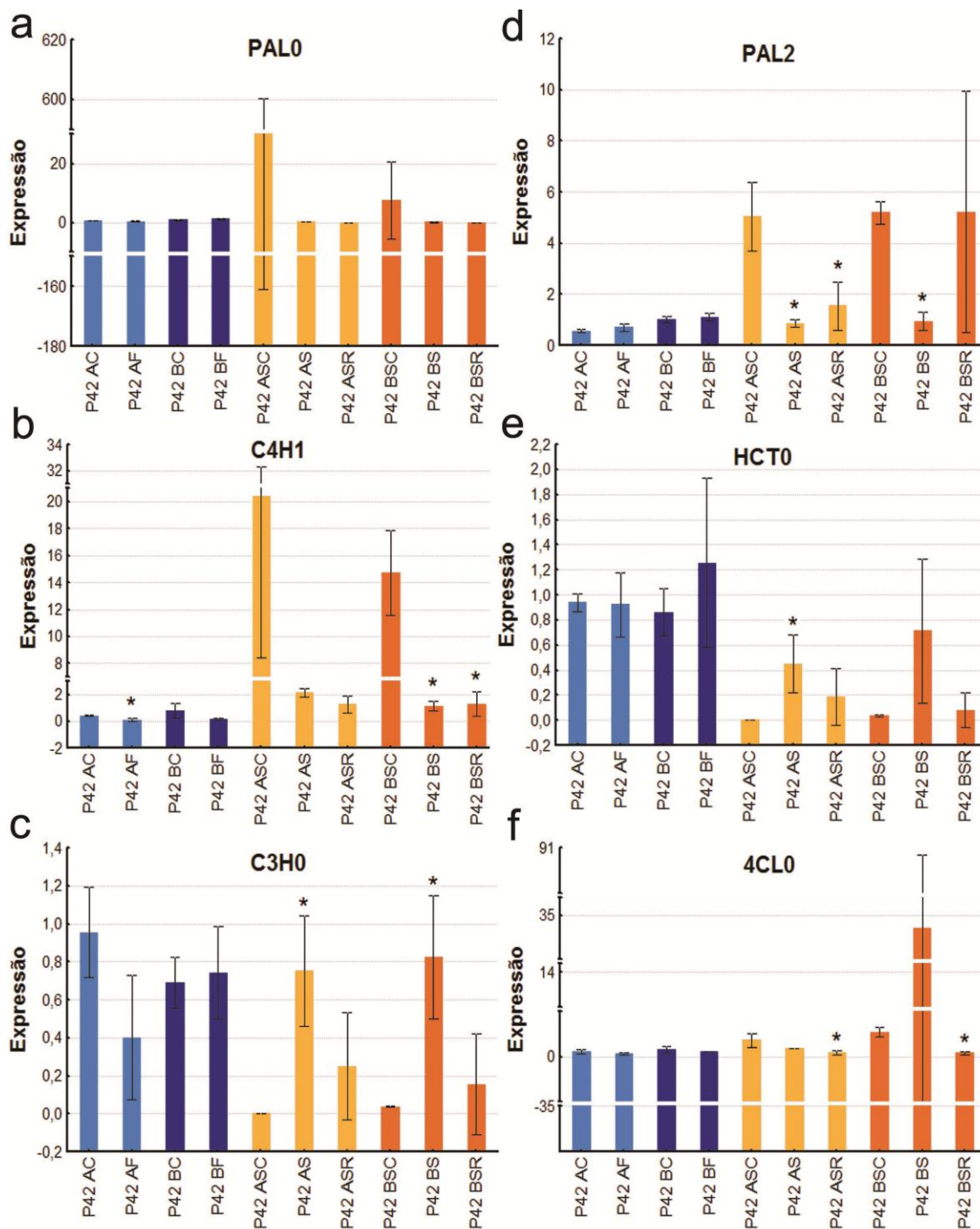


Figura 29. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

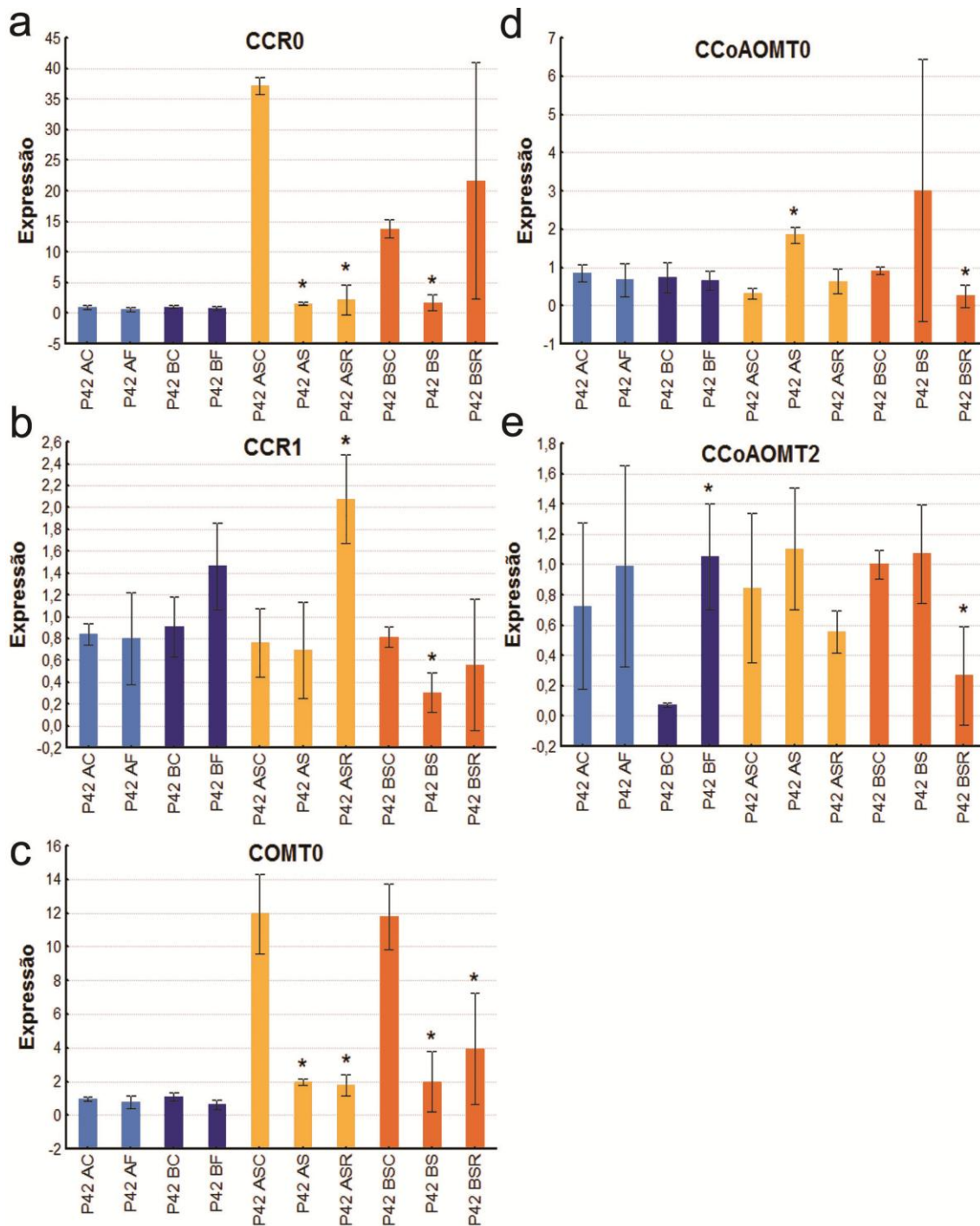


Figura 30 Expressão gênica (a-e) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

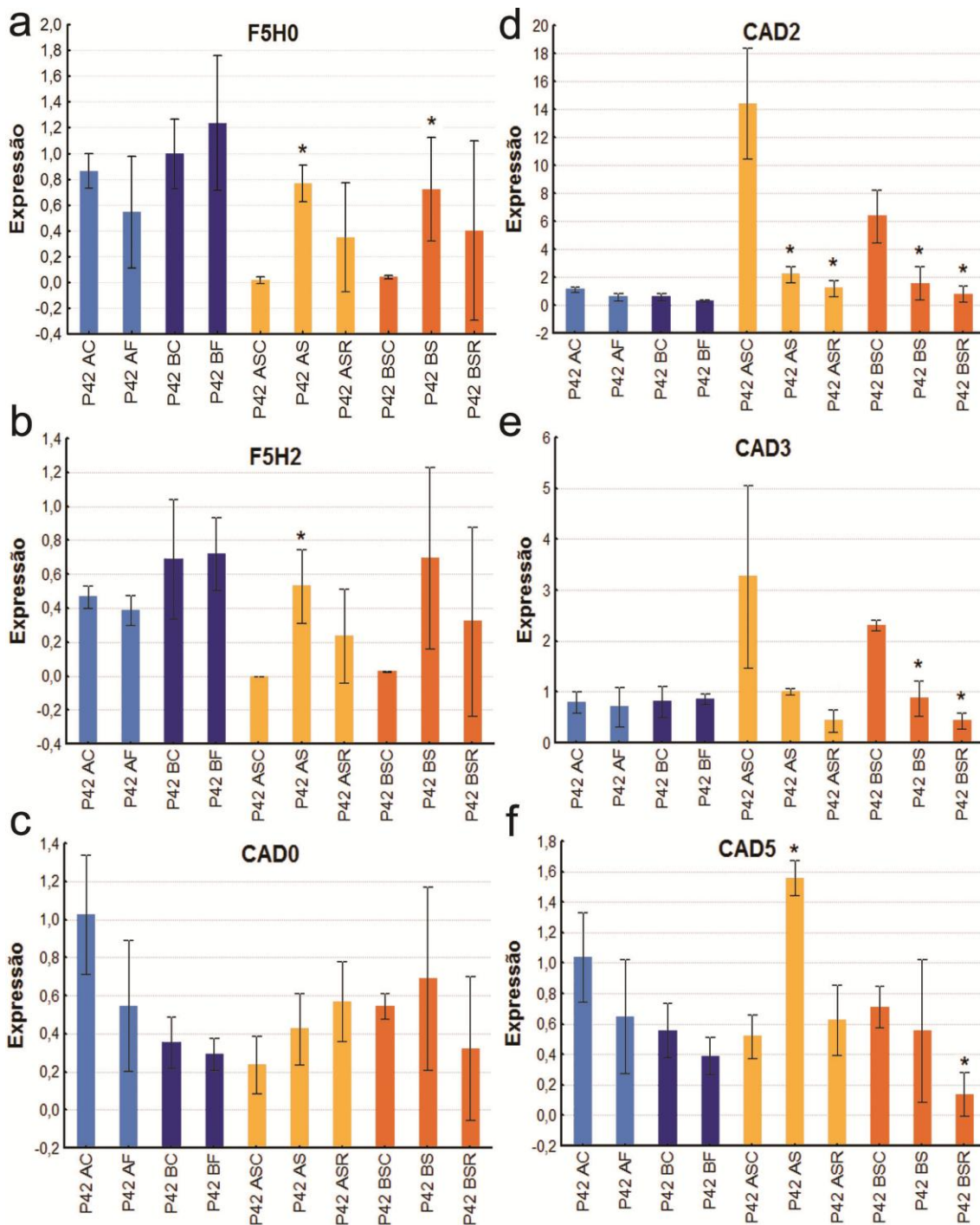


Figura 31. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias ± Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

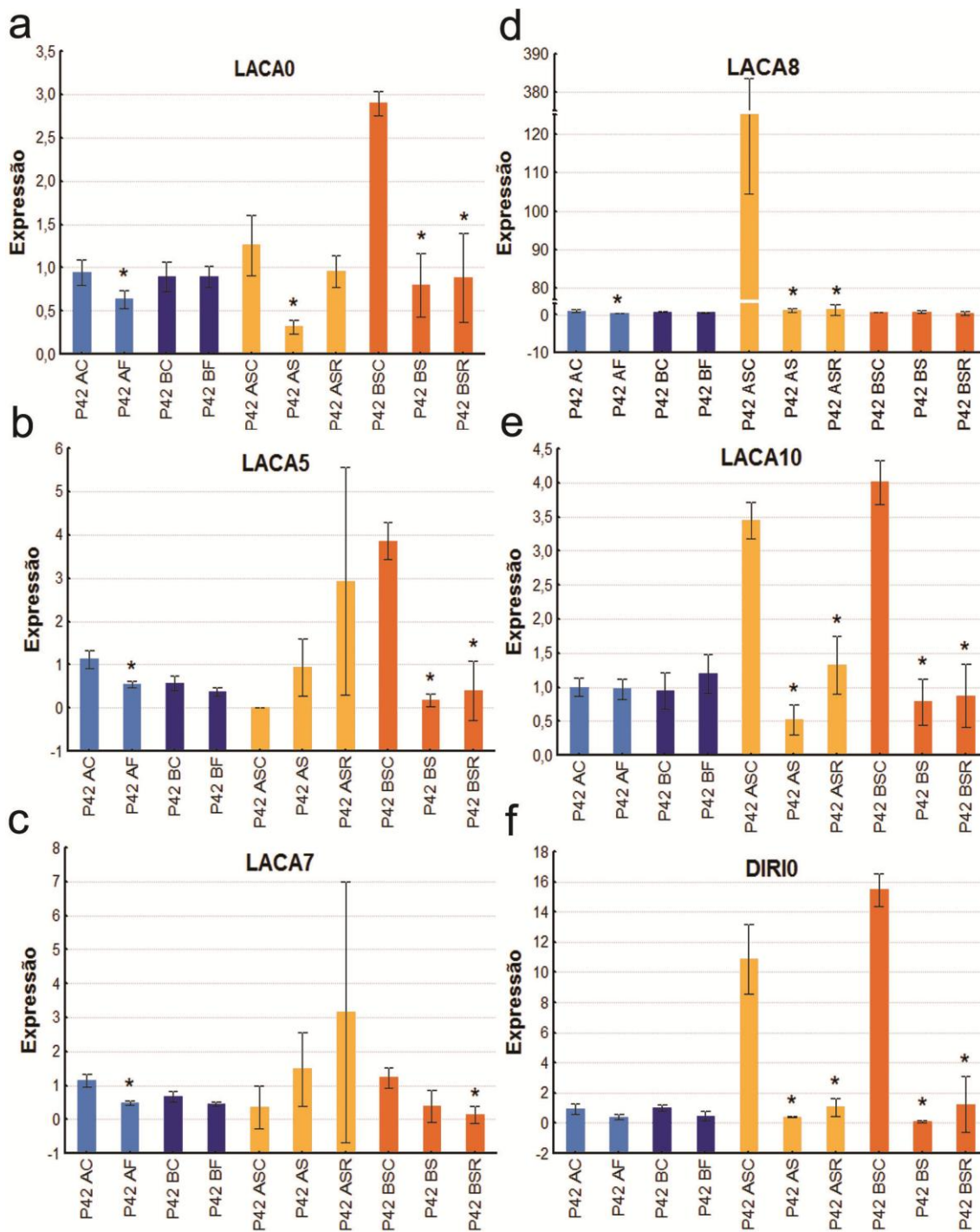


Figura 32. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

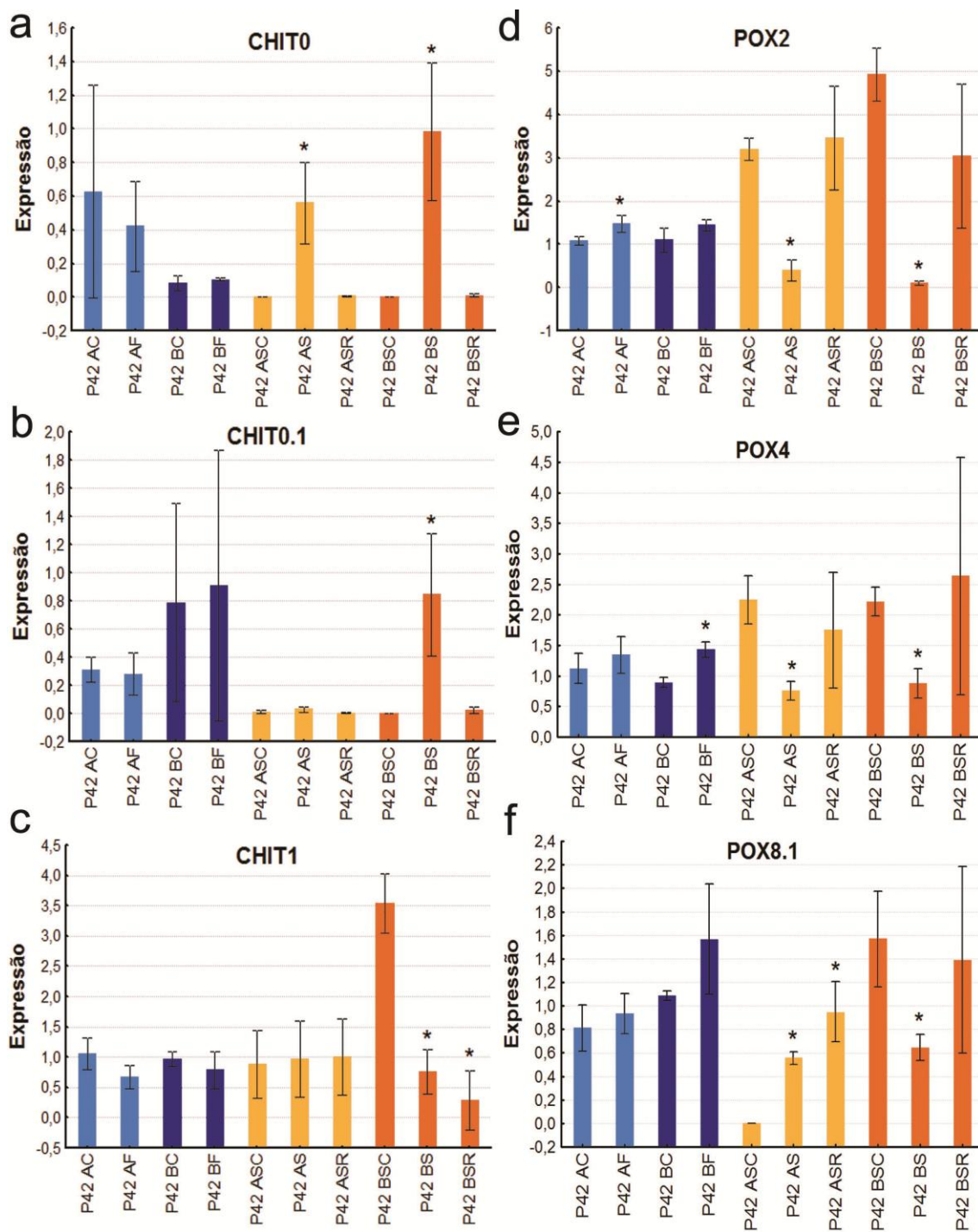


Figura 33. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. urograndis* P42 submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

| | P42 AC | P42 AF | P42 BC | P42 BF | P42 AC | P42 AS | P42 ASR | P42 BC | P42 BS | P42 BSR |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| PAL0 | | | | | | | | | | |
| PAL2 | | | | | | | | | | |
| C4H1 | | | | | | | | | | |
| HCT0 | | | | | | | | | | |
| C3H0 | | | | | | | | | | |
| 4CL0 | | | | | | | | | | |
| CCR0 | | | | | | | | | | |
| CCR1 | | | | | | | | | | |
| COMT0 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT0 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT2 | | | | | | | | | | |
| F5H0 | | | | | | | | | | |
| F5H2 | | | | | | | | | | |
| CAD0 | | | | | | | | | | |
| CAD2 | | | | | | | | | | |
| CAD3 | | | | | | | | | | |
| CAD5 | | | | | | | | | | |
| LACA0 | | | | | | | | | | |
| LACA5 | | | | | | | | | | |
| LACA7 | | | | | | | | | | |
| LACA8 | | | | | | | | | | |
| LACA10 | | | | | | | | | | |
| CHIT 0 | | | | | | | | | | |
| CHIT 0.1 | | | | | | | | | | |
| CHIT 1 | | | | | | | | | | |
| POX2 | | | | | | | | | | |
| POX4 | | | | | | | | | | |
| POX8.1 | | | | | | | | | | |
| DIRI 0 | | | | | | | | | | |

Figura 34. Esquema dos resultados de expressão gênica em *E. urograndis* P42 (P42). Cor mais escura que a indicada no controle, indica aumento significativo da expressão com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AC**: ápice controle; **BC**: base controle; **AF**: ápices expostos a frio; **BF**: bases expostas a frio; **AS**: ápices do grupo seca; **ASR**: ápices reidratados; **BS**: bases do grupo seca; **BSR**: bases reidratadas.

Quando as plantas são reidratadas (P42AS/SR) observamos que 7 dos 10 genes que apresentaram expressão reduzida na seca mantêm esta menor expressão no grupo reidratado (ápices do grupo seca recuperada) e são os genes: *PAL2*, *CCR0*, *COMT0*, *CAD2*, *LACA8*, *LACA10* e *DIR10* (Figs. 29-32 e 34), de modo que os outros 3 (*LACA0*, *POX2* e *POX4*), retornam aos níveis de expressão similares ao controle, P42AS/C (Figs. 32-34). Dos 8 genes que apresentam aumento de expressão no grupo seca, apenas o *POX8.1* mantêm esta maior expressão no grupo seca recuperada, de modo que os outros 7 retornam aos níveis de expressão similares ao controle (Fig. 34). Além disso, duas novas alterações surgiram no grupo seca recuperada: Menor expressão de *4CLO* e aumento da expressão de *CCR1* (Figs. 29, 30 e 34).

Assim, nos ápices de P42 grupo de plantas reidratadas (AS/SR), estes novos padrões de expressão constituídos por duas novas alterações na expressão gênica (*4CLO* e *CCR1*) juntamente com a participação dos genes que não retornaram aos níveis de expressão similares ao controle podem estar relacionados com o padrão de respostas bioquímicas encontrado neste grupo de plantas reidratadas, padrão este que se caracterizou pelo aumento do coniferaldeído, redução de G em ligações β -O-4, redução de S/G, redução de lignina insolúvel, aumento da lignina solúvel e aumento da digestibilidade. Este grupo de possíveis genes relacionados seria constituído por *PAL2*, *CCR0*, *COMT0*, *CAD2*, *LACA8*, *LACA10*, *DIR10*, *POX8.1*, *4CLO* e *CCR1*, e todos, com exceção de *POX8.1* e *CCR1*, tiveram a sua expressão reduzida nestas amostras.

Lapierre *et al.* (1999) demonstraram que plantas transgênicas com redução da expressão de *COMT* apresentam menor rendimento total de unidades ligadas por β -O-4, e aumento de coniferaldeído nas ligninas, o que está de acordo com a redução de ligações β -O-4 e aumento de coniferaldeído observado nestas amostras de *E. urograndis* P42 (ápice grupo

seca recuperada). Além disso, observamos aumento da digestibilidade da celulose, que também foi observado por Bernard-Vailhé *et al.* (1996) e por Fu *et al.* (2011) em plantas com supressão de *COMT*. Adicionalmente observamos redução da proporção S/G, que também foi relatada em plantas com redução da expressão de *COMT* (Fu *et al.*, 2011).

Plantas transgênicas de tabaco com supressão de *CCR* apresentaram redução do conteúdo de lignina e aumento da proporção S/G, devido, principalmente, à redução em G (Piquemal *et al.*, 1998). Deste modo, o aumento da expressão de *CCR1* nas nossas amostras de *E. urograndis* P42 (ápice grupo seca recuperada) poderia estar relacionado com a redução da proporção S/G observada. Além disso, tendo em vista que a *CCR* é a enzima que cataliza a redução dos ésters hidroxicinamoil-CoA aos respectivos aldeídos (Ralph *et al.*, 1998), o aumento da expressão de *CCR1* juntamente com a redução da expressão de *CAD2* poderia resultar em maior incorporação de coniferaldeído na lignina.

A supressão da expressão de *CAD*, enzima que reduz os cinamaldeídos formando os hidroxicinamoil álcoois também denominados monolignóis (ex.: álcool coniferílico, álcool sinapílico) (Hano *et al.*, 2006), resulta em incorporação de coniferaldeído na lignina (Higuchi *et al.*, 1994; Ralph *et al.*, 2001), o que está de acordo com o aumento de coniferaldeído observado nas nossas amostras de *E. urograndis* P42 (ápice grupo seca recuperada). Além disso, a redução da proporção S/G, aumento da lignina solúvel e redução da lignina insolúvel observada também podem estar relacionados com a redução da expressão de *CAD2*. A drástica supressão de *CAD* em tabaco (reduzida a 7% do controle) resultou em redução da proporção S/G, ocorrência de cinamaldeídos na lignina e aumento da extratibilidade alcalina das ligninas (Halpin *et al.*, 1994; Bernard Vailhé *et al.*, 1996b). A supressão de *CAD* diminui a quantidade de lignina insolúvel Klason, e aumenta a solubilização e a fragmentação da lignina durante a polpação Kraft (Lapierre *et al.*, 1999).

Como o grupo de possíveis genes relacionados com a promoção das características bioquímicas observadas nas amostras de *E. urograndis* P42 (AS/SR) é bem extenso, constituído de no mínimo 8 classes diferentes de genes, tentamos reduzir o número dos genes deste grupo fazendo uma comparação dos padrões de expressão deste grupo seca recuperada com a expressão nas demais amostras de P42 onde todos os resultados bioquímicos encontrados foram opostos, ou seja, comparamos a expressão de AS/SR com a expressão em amostras aonde foi observado redução de coniferaldeído, redução de lignina solúvel e redução de digestibilidade, o que correspondeu as amostras BS/S e BS/SR, e também com a amostra BF/F, onde foi observada redução de coniferaldeído e digestibilidade. Assim aos genes que tiveram o mesmo padrão de expressão nestas quatro amostras foram atribuídas menores chances de estarem relacionados com as diferenças bioquímicas observadas. A amostra AF/F também apresentou respostas contrastantes com relação a AS/SR, mas neste caso ela apresentou uma característica em comum que foi a redução de guaiacil em β -O-4, e sabendo-se que todas as outras respostas foram opostas, os genes expressos em comum (com mesmo padrão de expressão) entre AS/SR e AF/F mais provavelmente estariam relacionados com esta característica em comum que as mesmas compartilham.

Feita as comparações, houve um indicativo de que *DIR10*, *LACA10*, *CAD2*, *COMT0*, *CCR0*, *4CLO* e *PAL2* poderiam estar menos relacionados com o padrão bioquímico observado nos ápices de *E. urograndis* do grupo seca recuperada. Além disso, a partir destas comparações foi reforçado o possível papel de *POX 8.1*, *LACA8* e *CCR1* nas alterações bioquímicas benéficas observadas nestes ápices, fazendo destes genes os candidatos mais prováveis. Interessantemente, este grupo de candidatos mais prováveis inclui os únicos genes que apresentaram maior expressão nesta amostra com relação ao controle, que foram *POX 8.1* e *CCR1*. Além disso, o *CCR1* foi um dos dois genes que só alteraram a expressão neste grupo

seca recuperada, de modo que no grupo seca a sua expressão era similar ao do controle (o outro gene foi *4CL0*).

Cook *et al.* (2012) mostraram que em três linhagens diferentes de plantas transgênicas, cada uma delas com supressão de um gene diferente da rota de biossíntese de lignina (*CCR*, *C4H* ou *PEROXIDASE*), apresentam maior digestibilidade da celulose, sendo observado redução de todos os genes de lignina analisados, com exceção de um gene de peroxidase, que foi o único a aumentar a expressão, sendo que este aumento ocorreu na linhagem com supressão de *CCR*. Nas nossas amostras de ápices de *E. urograndis* do grupo seca recuperada, aonde observamos o aumento da expressão de dois genes, um deles foi um gene de peroxidase (*POX 8.1*), e assim como Cook *et al.* (2012), observamos aumento de digestibilidade.

Nas amostras de *E. urograndis* (ápices do grupo seca recuperada), o aumento do coniferaldeído nas ligninas e a redução de unidades G em β -O-4, observados, parecem estar relacionados com o aumento na expressão de *CCR1*, e, conseqüentemente, da *POX 8.1*, uma vez que a mesma poderia estar oxidando e promovendo a polimerização desidrogenativa do coniferaldeído, cujo *pool* disponível foi aumentado devido ao aumento da expressão de *CCR1* e redução da expressão de *CAD2*. Então, este grupo de genes mais prováveis é decisivo na observação ou não das características, entretanto agem em conjunto com os demais genes que são alterados, este novo padrão é responsável pelo perfil fenotípico observado.

Estes dados nos remetem a um questionamento: seria *POX8.1* a mesma enzima que promovia a polimerização do G em ligações β -O-4 em condições controle e que passou a promover a polimerização do coniferaldeído no lugar de G neste tipo de ligações? É possível que esta peroxidase não fosse a mesma que promovia a polimerização do G em ligações β -O-4 em condições controle, pois caso assim fosse, a simples promoção da polimerização do

coniferaldeído no lugar de G neste tipo de ligações manteria os níveis de expressão desta peroxidase iguais ao do controle. Embora não tenha sido observada redução da expressão de nenhum gene de peroxidase que poderia estar relacionado com a menor incorporação de guaiacil em β -O-4 no grupo seca recuperada, observamos redução de um *LACA8*, o qual poderia estar então relacionado com a polimerização desidrogenativa do guaiacil em ligações β -O-4.

Por outro lado, se a redução de *LACA8* não estiver relacionada com a redução da incorporação de G em β -O-4, pode ser possível então que a mesma peroxidase *POX8.1* promoveria a oxidação de ambos álcool coniferílico e coniferaldeído, e a sua expressão estaria aumentada no grupo seca recuperada, devido ao fato de que a mesma passou a polimerizar tanto o coniferaldeído em β -O-4 quanto o álcool coniferílico em ligações condensadas, visto que o conteúdo de álcool coniferílico foi aumentado mas sua incorporação em β -O-4 foi reduzida, indicando que este aumento de álcool coniferílico possa estar sendo incorporado em ligações condensadas. Sabe-se que álcool coniferílico pode ser sintetizado por uma rota alternativa sem que para isto tenha que ser reduzido diretamente do coniferaldeído, de modo que aumento de coniferaldeído e álcool coniferílico possam acontecer simultaneamente, tal como foi observado. Assim o coniferaldeído foi preferencialmente incorporado em β -O-4 no lugar de G, mas a quantidade de G não utilizada em β -O-4 poderia ter sido incorporada em ligações condensadas, explicando a maior expressão de *POX8.1*, que continuou oxidando o álcool coniferílico, mas agora também a quantidade aumentada de coniferaldeído.

Entretanto, quando comparamos esta amostra de P42AS/SR com a amostra de AF/F, as quais compartilham entre si apenas a característica de redução de G em ligações β -O-4, vemos que o único gene que apresenta o mesmo padrão de expressão entre elas é o *LACA8*, o qual é reduzido em ambas. Portanto, *LACA8* poderia de fato estar mais relacionado com a

polimerização desidrogenativa do guaiacil em ligações β -O-4 na condição controle e, portanto, *POX8.1* seria mais relacionado ao coniferaldeído.

5.3.2. *E. globulus*

Os resultados de expressão gênica em *E. globulus* encontram-se nas Figs. 35-39, e foram esquematizados na Fig. 40.

Em *E. globulus* temos que as possíveis alterações bioquímicas que poderiam ser benéficas do ponto de vista do aproveitamento do papel seria a amostra de ápices expostos a frio (AF/F), a qual apresentou aumento de lignina solúvel, e as amostras de ápices expostos a seca (AS/S) e ápice reidratado (AS/SR), as quais apresentaram aumento da proporção S/G.

Na amostra de AF/F, só foi observada alteração de um gene, e consistiu da redução da expressão de *CADI* e, portanto, este gene poderia estar relacionado com algumas das alterações observadas, as quais poderiam ser redução de coniferaldeído e aumento da lignina insolúvel e solúvel observado nos ápices no frio. Entretanto, em bases no frio, foi observado aumento da expressão de *CADI*, redução de coniferaldeído e aumento de lignina insolúvel. Assim, a redução da expressão de *CADI* em *E. globulus* AF/F possivelmente deve estar mais relacionada com ao aumento da lignina solúvel nestas amostras.

Nos ápices do grupo seca recuperada (AS/SR) foi observado redução de *LACA1*, *LACA6* e *DIR10*, os quais poderiam estar relacionados com a redução do coniferaldeído e lignina total nestas amostras e provavelmente não seriam relacionados com o aumento da proporção S/G, visto que em ápices na seca estes genes não foram alterados e também foi observado aumento de S/G. Comparando-se com as bases no ensaio de seca (BS/S e BS/SR), podemos supor que a redução de *LACA1* e *DIR10* tenha sido a alteração mais relacionada com a redução do coniferaldeído em *E. globulus*.

A partir da observação do que ocorre nas amostras de bases do ensaio de seca (BS/S e BS/SR) é possível dizer que o aumento da digestibilidade em *E. globulus*, possa estar relacionado com a redução da expressão de *CCR1* e *LACA0* e aumento da expressão de *HCT1* e *POX4*. Bem coerente com o observado por Cook *et al.* (2012), onde a supressão de *CCR* foi acompanhada de aumento da expressão de um gene de peroxidase e aumento da digestibilidade.

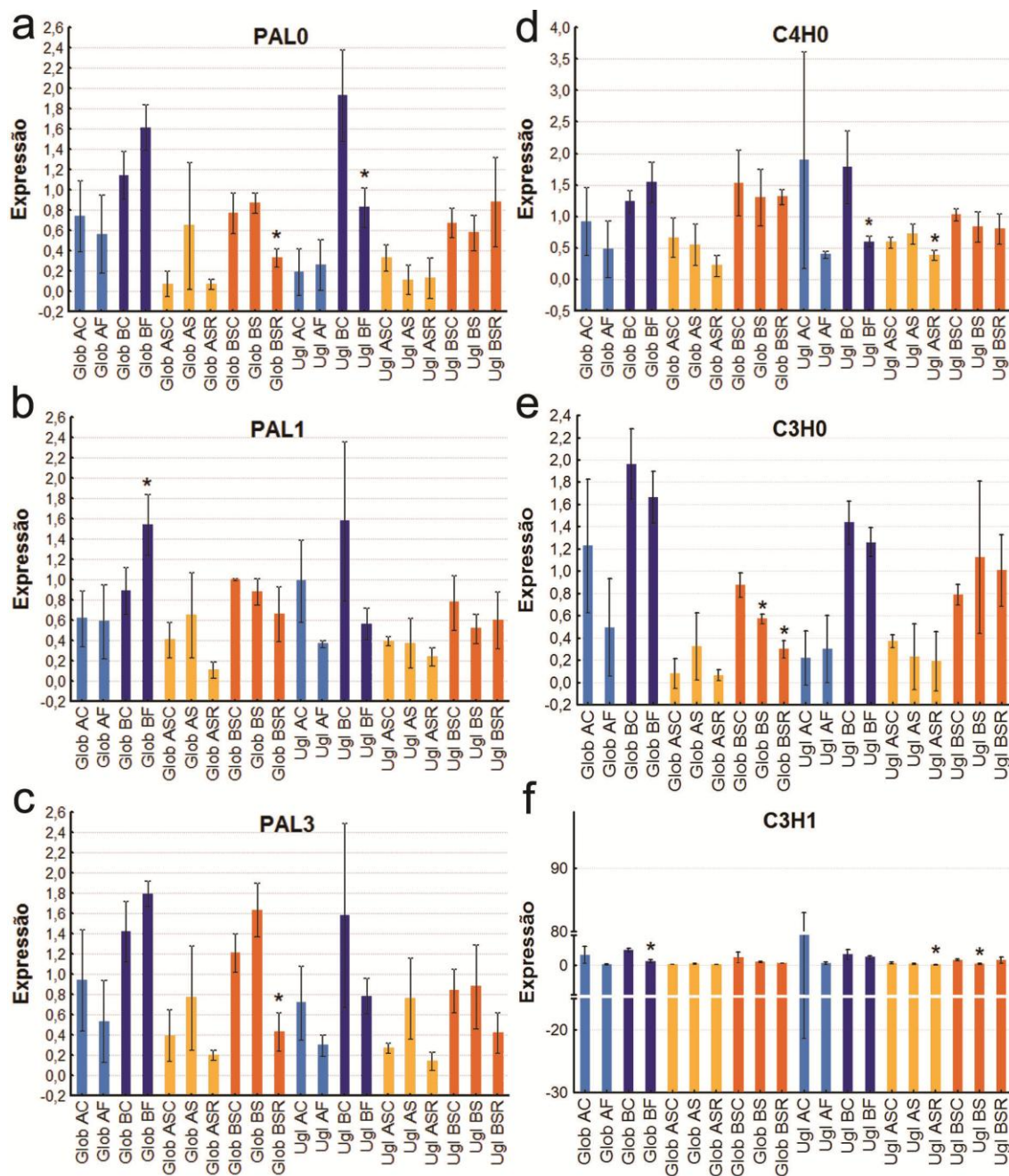


Figura 35. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. urolobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

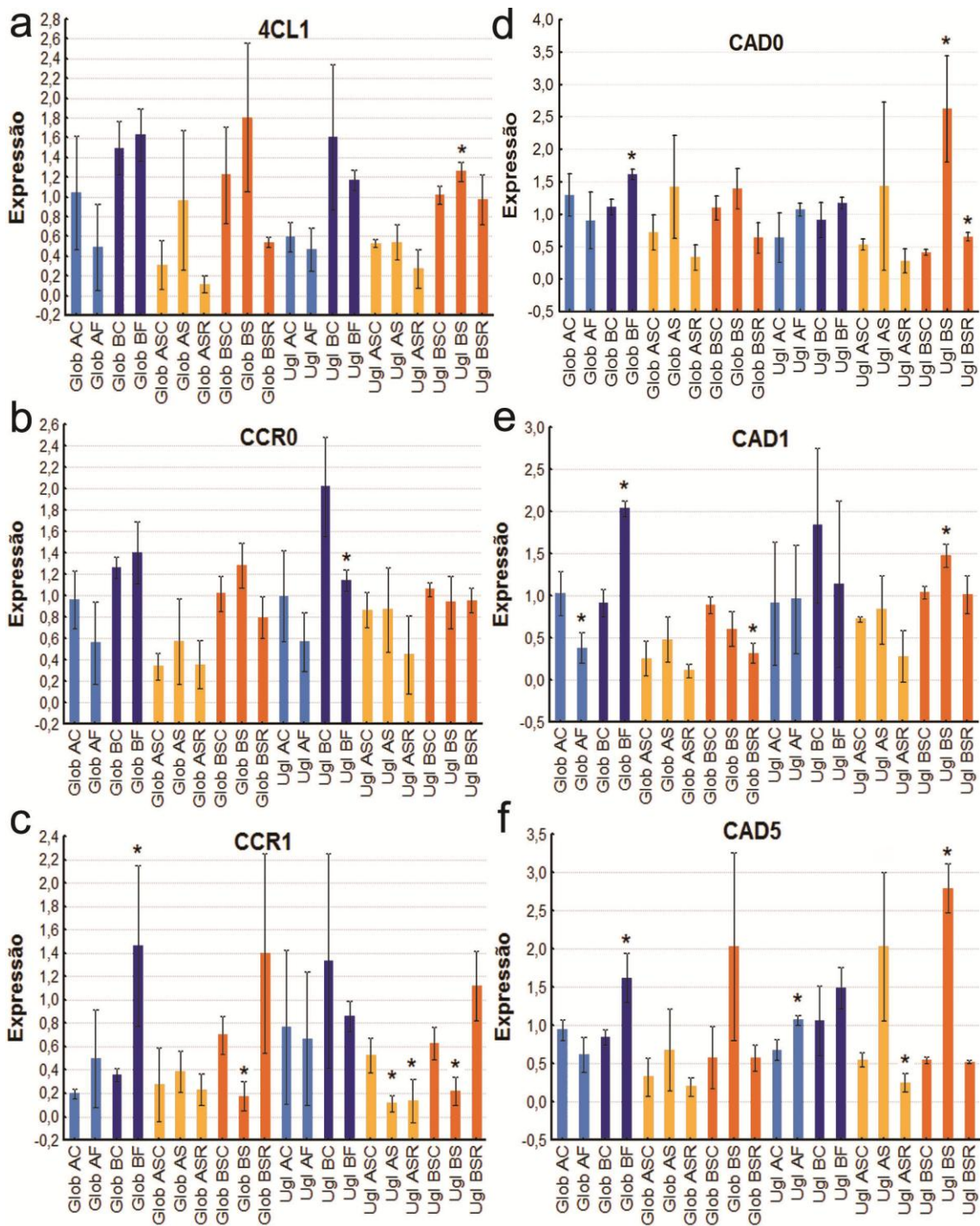


Figura 36. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias ± Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

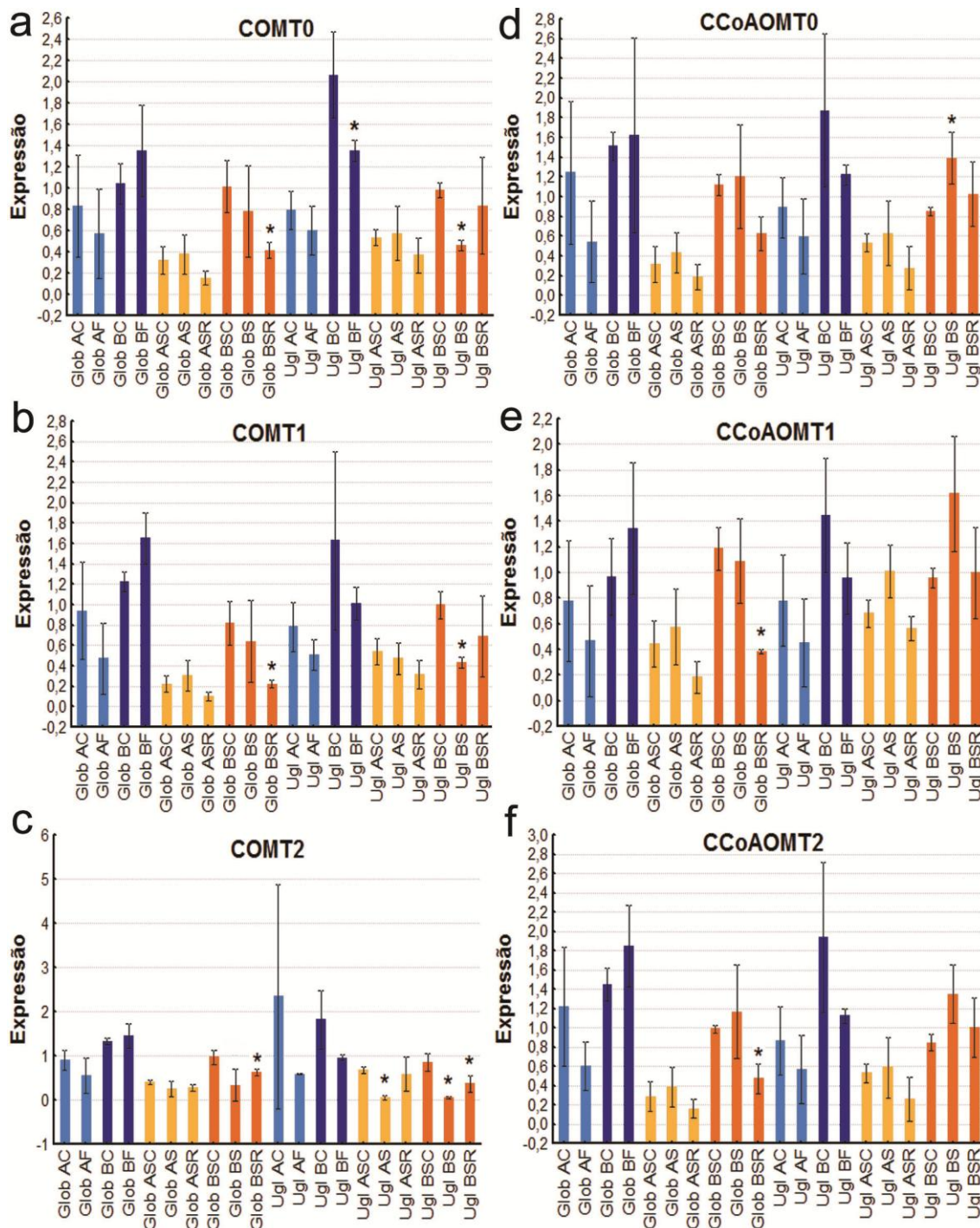


Figura 37. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

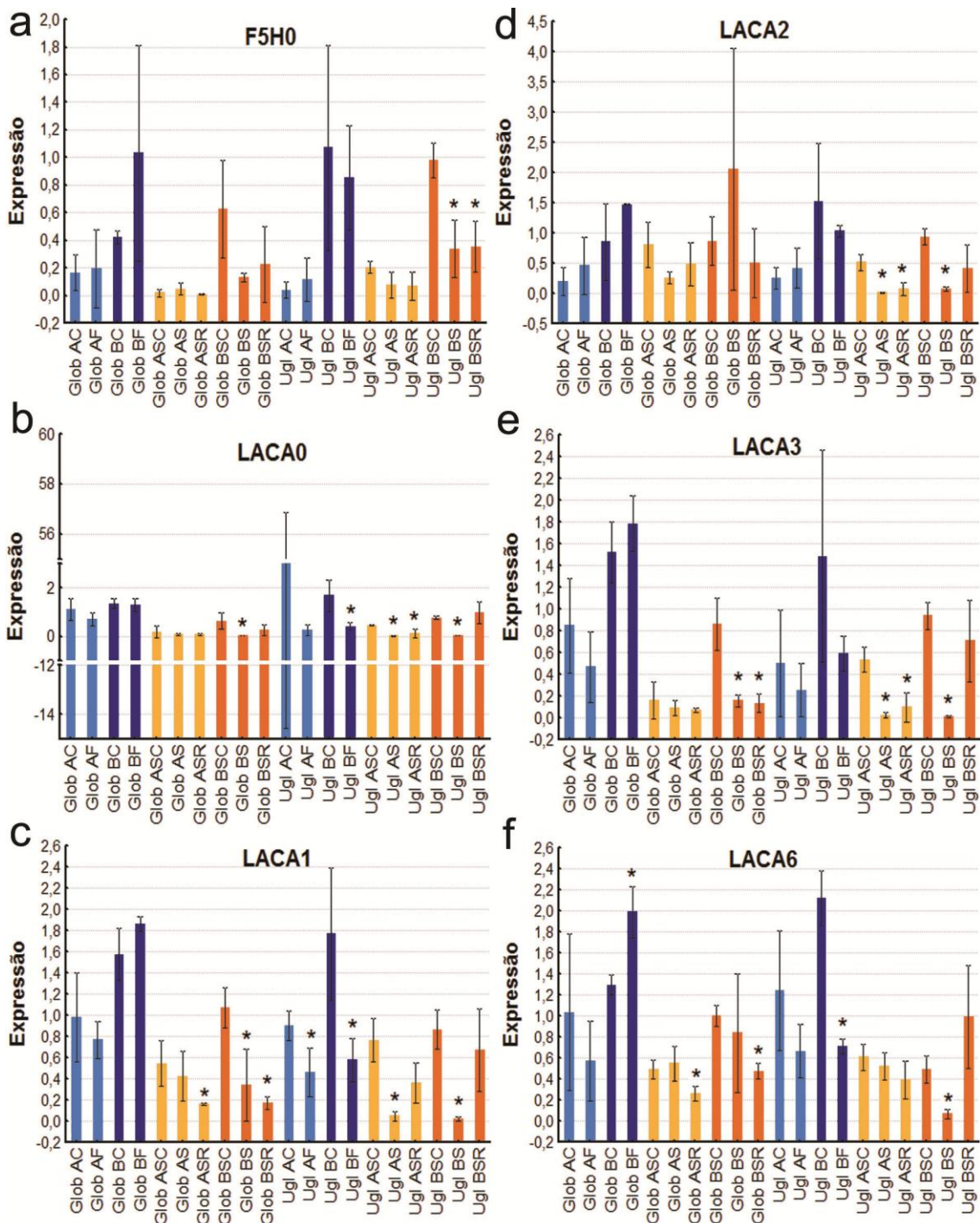


Figura 38. Expressão gênica (a-f) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

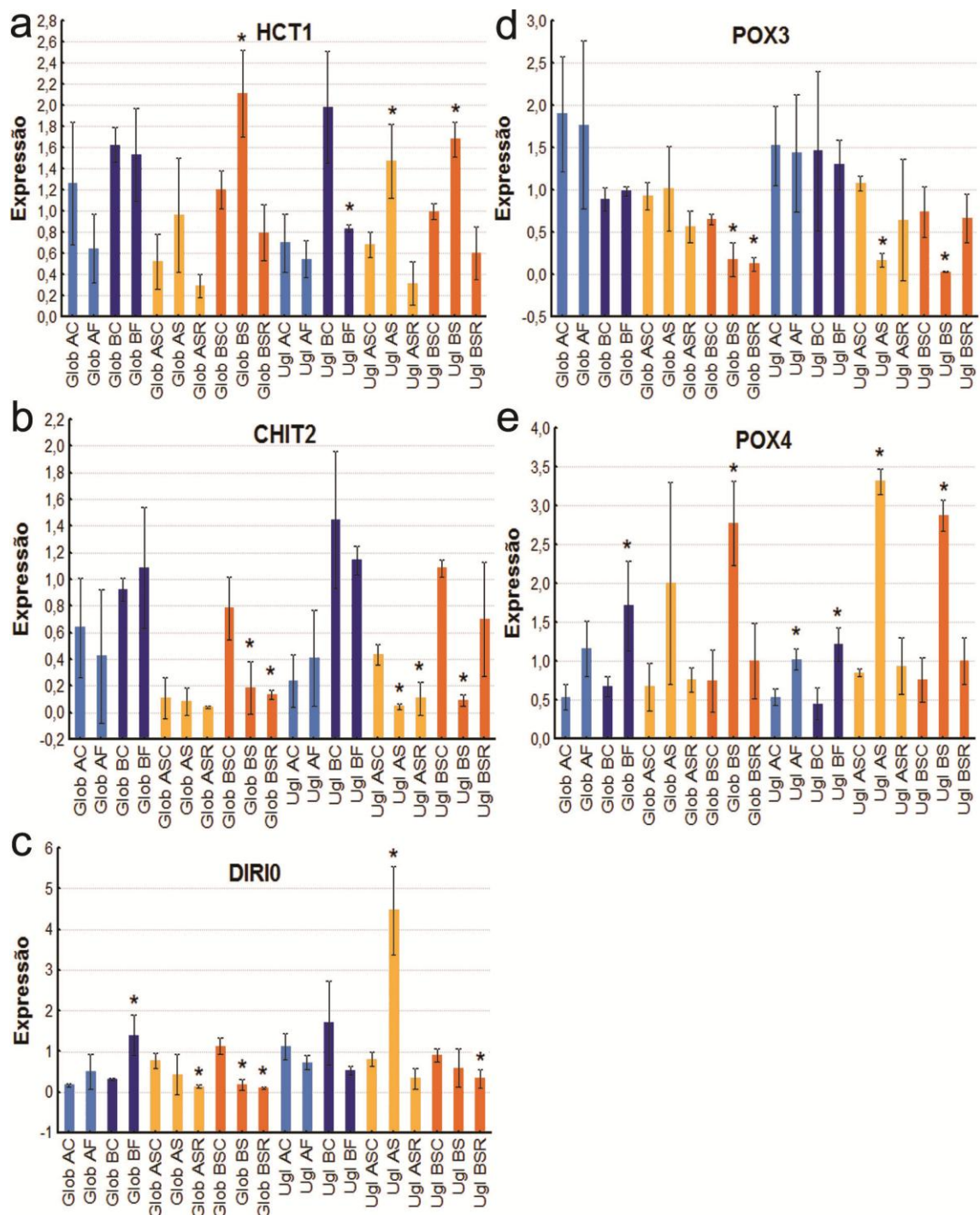


Figura 39. Expressão gênica (a-e) em ápices (A) e bases caulinares (B) de *E. globulus* (Glob) e *E. uroglobulus* (Ugl) submetidos a frio (F), seca (S), seca recuperada (SR) ou em condições controle (C). Médias \pm Desvio Padrão; n=3. * Diferenças significativas com relação ao seu respectivo controle de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

| | Glob AC | Glob AF | Glob BC | Glob BF | Glob AC | Glob AS | Glob ASR | Glob BC | Glob BS | Glob BSR |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|----------|
| PAL0 | | | | | | | | | | |
| PAL1 | | | | | | | | | | |
| PAL3 | | | | | | | | | | |
| C4H0 | | | | | | | | | | |
| HCT1 | | | | | | | | | | |
| C3H0 | | | | | | | | | | |
| C3H1 | | | | | | | | | | |
| 4CL1 | | | | | | | | | | |
| CCR0 | | | | | | | | | | |
| CCR1 | | | | | | | | | | |
| COMT0 | | | | | | | | | | |
| COMT1 | | | | | | | | | | |
| COMT2 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT0 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT1 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT2 | | | | | | | | | | |
| F5H0 | | | | | | | | | | |
| CAD0 | | | | | | | | | | |
| CAD1 | | | | | | | | | | |
| CAD5 | | | | | | | | | | |
| LACA0 | | | | | | | | | | |
| LACA1 | | | | | | | | | | |
| LACA2 | | | | | | | | | | |
| LACA3 | | | | | | | | | | |
| LACA6 | | | | | | | | | | |
| CHIT2 | | | | | | | | | | |
| POX3 | | | | | | | | | | |
| POX4 | | | | | | | | | | |
| DIRI 0 | | | | | | | | | | |

Figura 40. Esquema com todos os resultados de expressão gênica em *E. globulus* (Glob). Cor mais escura que a indicada no controle, indica aumento significativo da expressão com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AC:** ápice controle; **BC:** base controle; **AF:** ápices expostos a frio; **BF:** bases expostas a frio; **AS:** ápices do grupo seca; **ASR:** ápices reidratados; **BS:** bases do grupo seca; **BSR:** bases reidratadas.

5.3.3. *E. uroglobulus*

Os resultados de expressão gênica em *E. uroglobulus* encontram-se nas Figs. 35-39, e foram esquematizados na Fig. 41.

Nos ápices e bases de *E. uroglobulus* no frio, as respostas bioquímicas em comum foram aumento de lignina insolúvel e redução de coniferaldeído. Os genes que foram igualmente alterados nestas amostras foram o *LACAI* (reduzido) e *POX4* (aumentado), provavelmente sendo os mais relacionados com estas alterações observadas. Nos ápices de *E. uroglobulus* na seca e seca recuperada a resposta bioquímica em comum foi o aumento do coniferaldeído e os genes que foram igualmente alterados nestas amostras foram *CCRI*, *LACA0*, *LACA2*, *LACA3* e *CHIT2* (todos reduzidos), e portanto em conjunto com *LACAI* e *POX4* são os genes mais relacionados com as possíveis alterações do coniferaldeído nesta espécie.

Nas bases de *E. uroglobulus* no grupo seca recuperada (BS/SR), é observado aumento de siringil em ligações condensadas e aumento de lignina solúvel. Nas amostras de seca (BS/S) o aumento de siringil em ligações condensadas também foi observado, mas não observamos aumento de lignina solúvel neste grupo. Assim, os genes diferencialmente expressos no grupo seca recuperada seriam os candidatos mais relacionados com a lignina solúvel. Dos genes diferencialmente expressos (com relação ao controle) em BS/SR apenas o *DIRI0* não é expresso da mesma maneira em BS/S. Assim, a redução de *DIRI0* em BS/SR provavelmente esteja relacionada com o aumento da lignina solúvel.

| | Ugl AC | Ugl AF | Ugl BC | Ugl BF | Ugl AC | Ugl AS | Ugl ASR | Ugl BC | Ugl BS | Ugl BSR |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| PAL0 | | | | | | | | | | |
| PAL1 | | | | | | | | | | |
| PAL3 | | | | | | | | | | |
| C4H0 | | | | | | | | | | |
| HCT1 | | | | | | | | | | |
| C3H0 | | | | | | | | | | |
| C3H1 | | | | | | | | | | |
| 4CL1 | | | | | | | | | | |
| CCR0 | | | | | | | | | | |
| CCR1 | | | | | | | | | | |
| COMT0 | | | | | | | | | | |
| COMT1 | | | | | | | | | | |
| COMT2 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT0 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT1 | | | | | | | | | | |
| CCoAOMT2 | | | | | | | | | | |
| F5H0 | | | | | | | | | | |
| CAD0 | | | | | | | | | | |
| CAD1 | | | | | | | | | | |
| CAD5 | | | | | | | | | | |
| LACA0 | | | | | | | | | | |
| LACA1 | | | | | | | | | | |
| LACA2 | | | | | | | | | | |
| LACA3 | | | | | | | | | | |
| LACA6 | | | | | | | | | | |
| CHIT2 | | | | | | | | | | |
| POX3 | | | | | | | | | | |
| POX4 | | | | | | | | | | |
| DIRI 0 | | | | | | | | | | |

Figura 41. Esquema com todos os resultados de expressão gênica em *E. urolobulus* (Ugl). Cor mais escura que a indicada no controle, indica aumento significativo da expressão com relação ao controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). **AC**: ápice controle; **BC**: base controle; **AF**: ápices expostos a frio; **BF**: bases expostas a frio; **AS**: ápices do grupo seca; **ASR**: ápices reidratados; **BS**: bases do grupo seca; **BSR**: bases reidratadas.

5.3.4. Comparações entre Espécies

A amostra de *E. urograndis* P42 (AS/SR) e as duas amostras de *E. globulus* (AF/F e BS/S) compartilham entre si aumento da lignina solúvel ou aumento de digestibilidade (Fig. 42). Estas amostras, entretanto, divergem com relação ao coniferaldeído, o qual é reduzido nas amostras de *E. globulus* e aumentado nas amostras de *E. urograndis*. Assim, cabe fazer algumas comparações com relação ao padrão de expressão encontrado nestas amostras. Além disso, faremos comparação também com a amostra de base de *E. uroglobulus* exposta a frio (BF/F) a qual apresentou alterações bioquímicas que poderiam ser benéficas para a produção do papel, alterações estas que se constituíram de padrões de resposta ora apresentados nas amostras de *E. globulus*, outrora apresentados nas amostras de *E. urograndis*. Assim feito, será possível investigar se este padrão em “mosaico” em *E. uroglobulus* é encontrado também na expressão gênica.

Feitas as comparações (Fig. 42) foi observado que daqueles genes candidatos mais possivelmente relacionados com as alterações bioquímicas benéficas observadas nos ápices do grupo seca recuperada de *E. urograndis* P42 (genes *POX 8.1*, *LACA8* e *CCR1*), duas destas classes gênicas poderiam estar relacionadas com as alterações bioquímicas benéficas compartilhadas com *E. globulus* (BS/S), sendo que estes representantes em *E. globulus* seriam um gene de peroxidase (*POX4*) e um dos genes de lacase (*LACA0*, *LACA1* ou *LACA3*) os quais apresentaram-se com os mesmos padrões de expressão de *POX 8.1*, *LACA8* em *E. urograndis*, e poderiam estar relacionados com o aumento da digestibilidade nestas espécies.

A única semelhança entre *E. globulus* (AF/F) e *E. urograndis* P42 (AS/SR) é o aumento da lignina solúvel. A única semelhança com relação à expressão gênica é a redução

de um gene *CAD* (*CAD1* em *E. globulus* AF/F, e *CAD2* em P42 AS/SR, o que indica que a redução de *CAD* possa estar relacionada com o aumento da lignina solúvel nestas espécies.

Em *E. uroglobulus*, na amostra BF/F, observamos redução de coniferaldeído (o qual é observado também nas amostras de *E. globulus* (BS/S e AF/F) e observamos aumento de lignina solúvel (o que é observado tanto em *E. globulus*, AF/F, quanto em *E. urograndis*, AS/SR. Comparando-se ambas amostras mencionadas, observamos que em *E. uroglobulus*, a redução da expressão de *LACA0*, *LACA1* ou *LACA6* e o aumento da expressão de *POX4* poderiam estar relacionados com as características compartilhadas entre *E. uroglobulus* e *E. urograndis* de aumento de lignina solúvel. Entretanto, a redução de *LACA0*, *LACA1* ou *LACA6* e o aumento de *POX4* também poderiam estar relacionados com as características compartilhadas com *E. globulus*, e neste caso, seria com a redução do coniferaldeído. Assim, em *E. uroglobulus* a alteração na expressão destes genes poderia estar relacionado tanto com o aumento da lignina solúvel quanto com a redução do coniferaldeído.

Destas 4 amostras comparadas (P42 AS/SR, *Globulus* BS/S e AF/F e *E. uroglobulus* BF/F), apenas em *E. urograndis* P42 é observado aumento de coniferaldeído. A partir de comparações com estas amostras, os dois genes que possivelmente estejam relacionados com o aumento de coniferaldeído seriam *4CLO* e *CCR1*, os quais apresentam expressão diferencial nas outras amostras onde o coniferaldeído esteve reduzido. Interessantemente, *4CLO* e *CCR1* são também os únicos genes que observamos serem alterados nas amostras de ápices de P42 do grupo seca recuperada com relação às amostras de ápices do grupo seca nesta mesma espécie. Além disso, o *CCR1* já havia sido apontado com um dos três genes mais prováveis de estarem relacionados com as alterações observadas em P42 AS/SR.

| <i>E. urograndis</i> P42 AS/SR | | <i>E. globulus</i> BS/S | | <i>E. globulus</i> AF/F | | <i>E. uroglobulus</i> BF/F | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|---|------------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| ↑ Coniferaldeído e ↑ Lignina Solúvel | | ↓ Coniferaldeído | | ↓ Coniferaldeído ↑ Lignina Solúvel | | ↓ Coniferaldeído e ↑ Lignina Solúvel | |
| ↑ Digestibilidade | | ↑ Digestibilidade | | | | | |
| PAL0 | | PAL0 | | PAL0 | | PAL0 | ↓ |
| PAL2 | ↓ | PAL1 | | PAL1 | | PAL1 | |
| C4H1 | | PAL3 | | PAL3 | | PAL3 | |
| HCT0 | | C4H0 | | C4H0 | | C4H0 | ↓ |
| C3H0 | | HCT1 | ↕ | HCT1 | | HCT1 | ↓ |
| 4CL0 | ↓ | C3H0 | ↓ | C3H0 | | C3H0 | |
| CCR0 | ↓ | C3H1 | | C3H1 | | C3H1 | |
| CCR1 | ↑ | 4CL1 | | 4CL1 | | 4CL1 | |
| COMT0 | ↓ | CCR0 | | CCR0 | | CCR0 | ↓ |
| CCoAOMT0 | | CCR1 | ↓ | CCR1 | | CCR1 | |
| CCoAOMT2 | | COMT0 | | COMT0 | | COMT0 | ↓ |
| F5H0 | | COMT1 | | COMT1 | | COMT1 | |
| F5H2 | | COMT2 | | COMT2 | | COMT2 | |
| CAD0 | | CCoAOMT0 | | CCoAOMT0 | | CCoAOMT0 | |
| CAD2 | ↓ | CCoAOMT1 | | CCoAOMT1 | | CCoAOMT1 | |
| CAD3 | | CCoAOMT2 | | CCoAOMT2 | | CCoAOMT2 | |
| CAD5 | | F5H0 | | F5H0 | | F5H0 | |
| LACA0 | | CAD0 | | CAD0 | | CAD0 | |
| LACA5 | | CAD1 | | CAD1 | ↓ | CAD1 | |
| LACA7 | | CAD5 | | CAD5 | | CAD5 | |
| LACA8 | ↓ | LACA0 | ↓ | LACA0 | | LACA0 | ↓ |
| LACA10 | ↓ | LACA1 | ↓ | LACA1 | | LACA1 | ↓ |
| CHIT0 | | LACA3 | ↓ | LACA2 | | LACA6 | ↓ |
| CHIT0.1 | | LACA2 | | LACA3 | | LACA2 | |
| CHIT1 | | LACA6 | | LACA6 | | LACA3 | |
| POX2 | | CHIT2 | ↓ | CHIT2 | | CHIT2 | |
| POX4 | | POX3 | ↓ | POX3 | | POX3 | |
| POX8.1 | ↑ | POX4 | ↑ | POX4 | | POX4 | ↑ |
| DIRIO | ↓ | DIRIO | ↓ | DIRIO | | DIRIO | |

Figura 42. Comparação da expressão gênica entre espécies. Setas com sentido para cima e azuis indicam aumento significativo da expressão com relação ao respectivo controle. Setas com sentido para baixo e vermelhas indicam redução significativa da expressão com relação ao respectivo controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$). Cores de preenchimento de célula iguais indicam padrões de expressão gênica compartilhados entre as espécies. Cor verde em *E. uroglobulus* indica padrões de expressão encontrados tanto em *E. urograndis* P42 quanto em *E. globulus*. **AS/SR**: ápices do grupo seca recuperada; **BS/S**: bases expostas a seca; **AF/F**: ápices expostos a frio; **BF/F**: bases expostas a frio.

6. CONCLUSÕES

Apesar da complexidade dos parâmetros bioquímicos avaliados, acreditamos que alguns padrões puderam ser observados, e parcialmente entendidos do ponto de vista molecular. Vimos que estes padrões podem ser distintos em espécies diferentes, mas também observamos que algumas respostas podem ser compartilhadas. Deste modo, este trabalho pode indicar alguns genes possivelmente relacionados com alterações da lignina que poderiam ser benéficas do ponto de vista da produção do papel e ainda, que seriam desejáveis para a produção de biocombustíveis, embora este último caso não fosse o foco do trabalho. Observamos também que genes de uma mesma família podem estar relacionados com as mesmas respostas em espécies diferentes.

Em *E. urograndis* P42 a redução da expressão de *LACA8* e aumento da expressão de *POX8.1* e *CCR1*, juntamente com a redução de *CAD2* estariam envolvidos no aumento do coniferaldeído, lignina solúvel e digestibilidade. Além disso, o gene *4CLO* também poderia ter uma importância decisiva nas respostas observadas em P42 AS/SR, importância esta revisitada quando se fez comparações interespecíficas, as quais indicaram que a redução da expressão de *4CLO* em P42 AS/SR possa estar relacionada com o aumento do coniferaldeído.

Em *E. globulus*, comparações das amostras de BS/S e BS/SR indicaram que a redução da expressão de *LACA0*, *CCR1* e o aumento da expressão de *POX4* e *HCT1* poderiam estar relacionados com o aumento da digestibilidade da celulose. A análise das amostras de *E. globulus* AF/F e BF/F indicaram que a redução da expressão do gene *CAD1* poderia estar relacionado com o aumento da lignina solúvel. Ainda em *E. globulus*, a redução de *LACA1*, *LACA6* e *DIR10*, poderiam estar relacionados com a redução do coniferaldeído e lignina total.

Em *E. urolobulus*, comparações das amostras de BS/S e BS/SR indicaram que a redução da expressão em *DIR10* poderia estar relacionado com o aumento da lignina solúvel.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosin, E., Blanchette, R. A., Silva, H., Lapierre, C., Cease, K. R., Ibach, R. E., Abad, A. R., Muga, P., 1990. Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1) 65-74.
- Akgül, M., Çöpür, Y., Temiz, S., 2007. A comparison of kraft and kraft-sodium borohydrate brutia pine pulps. *Build. Environ.* 42:2586–2590.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F., 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.
- Barber, M.S. & Ride, J.P., 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.
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. V., Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(2):125-197.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Hano, C., Pilard, S., Grand, E., Lesur, D., Cailleu, D., Lamblin, F., Laine, E., Kovensky, J., Fliniaux, M., Mesnard., F., 2007. Coniferin dimerisation in lignan biosynthesis in flax cells. *Phytochemistry* 68: 2744-2752.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J., 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* 125: 198-209.

- Bernard-Vailhé, M. A., Cornu, A., Robert, D., Maillot, M., Besle, J. M., 1996b. Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality. *J. Agric Food Chem.* 44:1164-1169.
- Bernard-Vailhé, M. A., Migné, C., Cornu, A., Maillot, M. P., Grenet, E., Besle, J. M., Atanassova, R., Martz, F., Legrand, M., 1996. Effect of modification of the O-methyltransferase activity on cell wall composition, ultrastructure and degradability of transgenic tobacco. *J. Sci. Food Agric.* 72:385-391.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54: 519-546.
- Bok-Rye L, Kil-Yong K, Woo-Jin J, Jean-Christophe A, Alain O, Tae-Hwan K (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* 58, 1271–1271.
- Brown, L. And Torget, R., 1996. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Ethanol Project Laboratory Analytical Procedures, LAP-009, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, 80401.
- Bunzel, M., Schübler, A. and Saha, G. T., 2011. Chemical characterization of klason lignin preparations from plant-based foods. *J. Agric. Food Chem.* 59:12506-12513.
- Campbell, M. M., Sederoff, R.R., 1996. Variation in lignin content and composition. mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* 110:3-13.
- Chang S, Puryear J, Cairney J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep.* 11:113-116.

- Chen, F., Dixon, R., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat. Biotechnol.* 25: 759-761.
- Chundawat, S.P., Venkatesh, B., Dale, B.E., 2007. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnol. Bioeng.* 96: 219-231.
- Cook C. M., Daudi A., Millar D. J., Bindschedler L. V., Khan S., Bolwell G. P., Devoto A., 2012. Transcriptional changes related to secondary wall formation in xylem of transgenic lines of tobacco altered for lignin or xylan content which show improved saccharification. *Phytochemistry* 74: 79-89.
- Corredor, D.Y., Salazar, J.M., Hohn, K.L., Bean, S., Bean, B., Wang, D., 2009. Evaluation and characterization of forage sorghum as feedstock for fermentable sugar production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158 (1): 164-179.
- Davin, L. B., Lewis, N. G., 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* 123: 453-461.
- Davin, L. B., Lewis, N. G., 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 407-415.
- Davison, B.H., Drescher, S.R., Tuskan, G.A., Davis, M.F., Nghiem, N.P., 2006. Variation of S/G ratio and lignin content in a *Populus* family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 427-435.

- Day A., Ruel K., Neutelings G., Crônier D., David H., Hawkins S., Chabbert B., 2005. Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers. *Planta* 222: 234-245.
- Del Río J. C., Gutiérrez A., Hernando M., Landín P., Romero J., Martínez A. T., 2005. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 74:110-115.
- Del Río J. C., Rencoret J., Marques G., Li J., Gellerstedt G., Jiménez-Barbero J., Martínez A. T., Gutiérrez A., 2009. Structural characterization of the lignin from jute (*Corchorus capsularis*) fibers. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10271-10281.
- Dutt, D., Tyagi, C. H., 2011. Comparison of various eucalyptus species for their morphological, chemical, pulp and paper making characteristics. *Indian Journal of Chemical Technology*, 18: 145-151.
- Elissetche J. P., Valenzuela S., García R., Norambuena M., Iturra C., Rodríguez J., Mendonça R. T., Balocchi C. , 2011. Transcript abundance of enzymes involved in lignin biosynthesis of *Eucalyptus globulus* genotypes with contrasting levels of pulp yield and wood density. *Tree Genetics & Genomes* 7: 697-705.
- Eudes, A., George, A., Mukerjee, P., Kim, J. S., Pollet, B., Benke, P. I., Yang, F., *et al.*, 2012. Biosynthesis and incorporation of side-chain-truncated lignin monomers to reduce lignin polymerization and enhance saccharification. *Plant Biotechnology Journal* 10: 609-620.

- Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Silva, A., Domingues, P., Amado, F., Robert, D., Faix, O., 2001. Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* wood. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4252-4261
- Fan, L., Linker, R., Gepstein, S., Tanimoto, E., Yamamoto, R., Neumann, P.M., 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiol.* 140, 603–612.
- Fontaine, A. S., Bout, S., Barriere, Y., Vermerris, W., 2003. Variation in cell wall composition among forage maize (*Zea mays* L.) inbred lines and its impact on digestibility: analysis of neutral detergent fiber composition by pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 8080-8087.
- Fu, C., Mielenz, J. R., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C. Y., Rodriguez Jr., M., Chen, F., Foston M., Ragauskas, A., Bouton, J., Dixon, R. A., Wang, Zeng-Yu., 2011. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *PNAS* 108: 3803-3808.
- Gómez-Ros L. V., Espiñeira J. M., Pomar F., Núñez-Flores M. J. L., Barceló A. R., 2007. *p*-hydroxycinnamyl aldehydes in lignifying plant cell walls. Issue in Honor of Prof. Attar-Rahman 7: 167-171.
- Grabber J. H., Ralph J., Hatfield R. D., 1998. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferaldehyde. *J. Sci Food Agric.* 78: 81-87.

- Grabber, J. H., Ralph, J., Hatfield, R. D., Quideau, S., 1997. *P*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. *J. Agric. Food Chem* 45: 2530-2532.
- Guerra A., Elissetche J. P., 2008. Influence of lignin structural features on *Eucalyptus globulus* kraft pulping. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47: 8542-8549.
- Guerra, A., Filpponen, I., Lucia, L. A., Argyropoulos, D. S., 2006. Comparative Evaluation of Three Lignin Isolation Protocols for Various Wood Species. *J. Agric Food Chem.* 54: 9696-9705.
- Guerra, A., Mendonc, R., Ferraz, A., Lu, F. Ralph, J., 2004. Structural Characterization of Lignin during *Pinus taeda* Wood Treatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7): 4073-4078.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hallac, B. B, Pu, Y., Ragauskas, A. J., 2010. Chemical transformations of *Buddleja davidii* lignin during ethanol organosolv pretreatment. *Energy Fuels* 24: 2723-2732.
- Halpin, C., Knight, M.E., Foxon, G. A., Campbell, M., Boudet, A. M., Boon, J. J., Chabbert, B, Tollier, M-T., Schuch, W., 1994. Manipulation of lignin quality by down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.* 6: 339-350.
- Hano, C., Addi, M., Bensaddek, L., Crônier, D., Baltora-Rosset, S., Doussot, J., Maury, S., Mesnard, F., Chabbert, B., Hawkins, S., Lainé, E., Lamblin, F., 2006. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* 223: 975- 989.

- Hatfield, R., Fukushima, R. S., 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* 45: 832-839.
- Higuchi T., Ito T., Umezawa T., Hibino T., Shibata D., 1994. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: Wine-red lignin from coniferyl aldehyde. *J. Biotechnol.* 37: 151-158.
- Huang, G., Shi, J. X., Langrish, T. A. G., 2007. A new pulping process for wheat straw to reduce problems with the discharge of black liquor. *Bioresour. Technology* 98: 2829-2835.
- Huntley S., Ellis D., Gilbert M., Chapple C., Mansfield S., 2003. Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H-transformed poplars: improved chemical savings and reduced environmental toxins. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6178-6183.
- Ibarra, D., Chávez, M.I., Rencoret, J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Romero, J., Camarero, S., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Martínez, A.T., 2007. Lignin modification during *Eucalyptus globulus* kraft pulping followed by totally chlorine free bleaching: a two-dimensional nuclear magnetic resonance, Fourier transform infrared, and pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry study. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3477–3499.
- Ibarra, D., del Río, J. C. , Gutiérrez , A., Rodríguez, I. M., Romero, J., Martínez, M. J., Martínez, A. T., 2005. Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 74: 116-122.
- Ito, T., Hayase, R., Kawai, S., Ohashi, H., Higuchi, T., 2002. Coniferyl aldehyde dimers in dehydrogenative polymerization: model of abnormal lignin formation in cinnamyl alcohol dehydrogenase-deficient plants. *J Wood Sci.* 48:216-221.

- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., Elisashvili, V., 2005. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22(4):391-397.
- Khristova, P., Kordsachia, O., Patt, R., Dafaalla, S., 2006b. Alkaline pulping of some eucalypts from Sudan. *Bioresource Technology* 97: 535-544.
- Khristova, P., Kordsachia, O., Patt, R., Karar, I., Khider, T., 2006a. Environmentally friendly pulping and bleaching of bagasse. *Industrial Crops and Products* 23: 131-139.
- Kishimoto T., Chiba W., Saito K., Fukushima K., Uraki Y., Ubukata M., 2010. Influence of syringyl to guaiacyl ratio on the structure of natural and synthetic lignins. *J. Agric. Food Chem.* 58: 895-901.
- Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leple J-C, Boerjan W, Ferret V, Nadai V De, Jouanin L., 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid o-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol.* 119:153-163.
- Li, L., Cheng, X. F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S. A., Chiang, V. L., 2001. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Cell* 13: 1567-1585.
- Li, X., Ximenes, E., Kim, Y., Slininger, M., Meilan, R., Ladisch, M., Chapple, C., 2010. Lignin monomer composition affects *Arabidopsis* cell-wall degradability after liquid hot water pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* 27(3): 1-7.

- Lisboa, S. A., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Goodfellow, B. J., 2005. Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. *Carbohydrate Polymers* 60:77-85.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Lourenço A., Baptista I., Gominho J., Pereira H., 2008. The influence of heartwood on the pulping properties of *Acacia melanoxylon* wood. *J. Wood Sci.*54:464-469.
- Marita J. M, Ralph J., Hatfield R. D., Chapple C., 1999. NMR characterization of lignins in *Arabidopsis* altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *PNAS* 96:12328-12332.
- Möller R., Steward D., Phillips L., Flint H., Wagner A., 2005. Gene silencing of cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Pinus radiata* callus cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 1061-1066.
- Morreel K., Kim H., Lu F., Dima O., Akiyama T., Vanholme R., Niculaes C., Goeminne G., Inzé D., Messens E., Ralph J., Boerjan W., 2010. Mass spectrometry-based fragmentation as an identification tool in lignomics. *Anal. Chem.* 82: 8095-8105.
- Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. O. F., Dornelas M. C., Mazzafera P., 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (4): 360-376.
- Moura, J. C. M. S., Araújo, P., Brito, M. S., Souza, U. R., Viana, J. O. F., Mazzafera, P., 2012. Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. *BMC Research Notes* (5): 634.

- Müsel G, Schindler T, Bergfeld R, Ruel K, Jacquet G, Lapierre C, Speth V, Schopfer P., 1997. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* 201:146-159.
- Nascimento, E. A., Morais, S. A. L., 1998. Ozonólise das ligninas organossolve e kraft eucalipto. parte II: Cinética nos meios ácido e básico. *Química Nova* 21(5): 578-583.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J.Biol.Chem.* 153: 375-80.
- Önnerud, H., Gellerstedt, G., 2003. Inhomogeneities in chemical structure of hardwood lignins. *Holzforschung* 57:255-265.
- Pilate, G., Dejardin, A., Leple, Jean-Charles, 2012. Field trials with lignin-modified transgenic trees. IN: *Lignins: Biosynthesis, biodegradation and bioengineering* (L. Jouanin and C. Lapierre, eds) Vol. 61, 1st Edition, Elsevier, pp.1-36.
- Pinto, P. C., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., 2005. Effects of structural features of wood biopolymers on hardwood pulping and bleaching performances. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44: 9777-9784
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A. M. 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes in lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 13: 71-83.
- Pu Y., Chen F., Ziebell A., Davison B. H., Ragauskas A. J., 2009. *Bioenergy Res.* 2:198-208.

- Raj, A., Reddy, M. M. K., Chandra, R., Purohit, H. J., Kapley, A., 2007. Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus sp.* Isolated from sludge of pulp and paper mill. *Biodegradation* 18:783-792.
- Ralph J., Akiyama T., Kim H., Lu F., Schatz P. F., Marita J. M., Ralph S. A., Reddy M. S., Chen F., Dixon R. A., 2006. *J. Biol. Chem.*, 281: 8843-8853.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C., Boudet, A. M., 1998. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95 (22): 12803-12808.
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J. M., Kim, H., Lu, F., Hatfield, R. D., Ralph, S., Chapple, C., *et al.*, 2001. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT- deficient plants by NMR. *Phytochemistry*, 57: 993-1003.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A. and Christensen, J. H., 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3: 29-60.
- Rencoret J., Marques G., Gutiérrez A., Nieto L., Jiménez-Barbero J., Martínez A. T., del Río J. C., 2009. Isolation and structural characterization of the milled-wood lignin from *Paulownia fortunei* wood. *Industrial Crops and Products*, 30: 137-143.
- Río, J. C., Gutiérrez, A., Hernando, M., Landín, P., Romero, J., Martínez, A. T., 2005. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 74: 110-115

- Rogers, L. A., Dubos, C., Cullis, I. F., Surman, C., Poole, M., Willment, J., Mansfield, S. D., Campbell, M. M., 2005. Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56 (416): 1651-1663.
- Rolando C, Monties B, Lapierre C (1992) Thioacidolysis. In: Lin SY, Dance CW (eds) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Heidelberg, pp 334-339.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. Disponível em <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.
- Shi, Zheng-Jun, Xiao, Ling-Ping, Jia-Deng, Xu, F., Sun, Run-Cang, 2012a. Physicochemical characterization of lignin fractions sequentially isolated from bamboo (*Dendrocalamus brandisii*) with hot water and alkaline ethanol solution. *Journal of Applied Polymer Science*, 125:3290-3301.
- Shi, H., Liu, Z., Zhu, L., Zhang, C., Chen, Y., Zhou, Y., Li, F., and Li, X., 2012b. Overexpression of cotton (*Gossypium hirsutum*) dirigent1 gene enhances lignifications that blocks the spread of *Verticillium dahlia*. *Acta Biochim Biophys Sin.* 44: 555-564
- SOMOGY, Michael, 1945. A new reagent for the determination of sugars. p. 61-68.
- Studer, M. H., DeMartini, J. D., Davis, M. F. Sykes, R. W., Davison, B., Keller, M., Tuskan, G. A., Wyman, C. E., 2011. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. *PNAS* 108: 6300-6305.
- Sun R. C., Tomkinson, J., Zhu, W., Wang, S. Q., 2000. Delignification of maize stems by peroxymonosulfuric acid, peroxyformic acid, peracetic acid, and hydrogen peroxide. 1.

- Physicochemical and structural characterization of the solubilized lignins. *J. Agric. Food Chem.* 48:1253-1262.
- Sun, R., Xiao, B., Lawther, J. M., 1998. Fractional and Structural Characterization of Ball-Milled and Enzyme Lignins from Wheat Straw. *J. Appl. Polym. Sci.* 68:1633-1641.
- Sun, Shao-Ni, Li, Ming-Fei, Yuan, Tong-Qi, Xu, F., Sun, Run-Cang, 2012. Sequential extractions and structural characterization of lignin with ethanol and alkali from bamboo (*Neosinocalamus affinis*). *Industrial Crops and Products* 37: 51-60
- Sun, Yong-Chang, Wen, Jia-Long, Xu, F., Sun, Run-Cang, 2010. Fractional and structural characterization of organosolv and alkaline lignins from *Tamarix austromogoliac*. *Scientific Research and Essays* 5(24): 3850-3864.
- Tejado A., Pena C., Labidi J., Echeverria J. M., Mondragon I., 2007. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. *Bioresour. Technol.* 98: 1655-1663.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Toledano, A., García, A., Mondragon, I., Labidi, J., 2010. Lignin separation and fractionation by ultrafiltration. *Sep Purif. Technol.*, 71:38-43
- Tsai, Chung-Jui; Popko, J. L.; Mielke, M. R.; Hu, Wen-Jing.; Podila; G. K.; Chiang, V. L., 1998. Suppression of *O*-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. *Plant Physiol.* 117:101-112.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: 1-11.
- Vincent D, Lapierre C, Pollet B, Cornic G, Negroni L, Zivy M (2005) Water deficits affect caffeate *O*-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol.* 137, 949–960.
- Wagner A., Donaldson L., Kim H., Phillips L., Flint H., Steward D., Torr K., Koch G., Schmitt U., Ralph J., 2009. Suppression of 4-coumarate- CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata*. *Plant Physiology* 149:370-383.
- Wang, H., Xue, Y., Chen, Y., Li, R., Wei, J., 2012. Lignin modification improves the biofuel production potential in transgenic *Populus tomentosa*. *Industrial Crops and Products*, 37:170-177.
- Wu, R., Wang, L., Wang, Z., Shang, H., Liu, X., Zhu, Y., Qi, D., Deng, X., 2009. Cloning and expression analysis of a dirigent protein gene from the resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Progress in Natural Science* 19: 347-352.
- Xiao, L., Xu, F., Sun, Run-Cang, 2011. Chemical and structural characterization of lignins isolated from *Caragana sinica*. *Fibers and Polymers* 12 (3):316-323.
- Xie Y., 2004. Difference of condensed lignin structures in eucalyptus species. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 19:18-21.
- Xu, B., Escamilla-Treviño, L. L., Sathitsuksanoh, N, S., Shen, Z., Shen, H., Zhang, Y-H. P., Dixon, R. A. and Zhao, B., 2011. Silencing of 4-coumarate:coenzyme A ligase in

switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production. *New Phytologist* 192 (3):611-625.

Xu, F., Sun, Run-Cang, Zhai, Mei-Zhi, Sun, Jin-Xia, Jiang, Jian-Xin, Zhao, Guang-Jie, 2008. Comparative Study of Three Lignin Fractions Isolated from Mild Ball-Milled *Tamarix austromogoliac* and *Caragana sepium*. *Journal of Applied Polymer Science* 108: 1158-1168.

Yahiaoui N., Marque C., Myton K. E., Negrel J., Boudet A. M., 1998. Impact of different levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants. *Planta* 204: 8-15.

Yasuda, S., Fukushima, K., Kakehi, A., 2001. Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulfuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood. *J Wood Sci.* 47:69-72.

Yoshimura, K., Masuda, A., Kuwano, M., Yokota, A., Akashi, K., 2008. Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C-3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiol.* 49, 226–241.

Hausman J. F., Evers D., Thiellement H., Jouve L., 2000. Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Reports*, 19: 954-960.

Zagoskina, N. V., Olenichenko, N. A., Klimov, S. V., Astakhova, N. V., Zhivukhina, E. A., Trunova, T. I., 2005. The effects of cold acclimation of winter wheat plants on changes in CO₂ exchange and phenolic compound formation. *Russian Journal of Plant Physiology* 52:320-325.

Ziebell A., Gracom K., Katahira R., Chen F., Pu Y., Ragauskas A., Dixon R. A., Davis M., 2010. Increase in 4-coumaryl alcohol units during lignification in alfalfa (*Medicago sativa*) alters the extractability and molecular weight of lignin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50): 38961-38968.

Anderson M. D., Prasad T. K., Stewart C. R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione-reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109: 1247-1257.