DÉBORA PAGLIUSO

**PADRÕES DE ALOCAÇÃO DE CARBONO ESTRUTURAL E
NÃO ESTRUTURAL EM CINCO ESPÉCIES DE LENTILHAS
D'ÁGUA (Lemnaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto de Biociências para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia

São Paulo

2018

DÉBORA PAGLIUSO

**Padrões de alocação de carbono estrutural e não estrutural em cinco espécies
de lentilhas d'água (Lemnaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível
tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pagliuso, Débora

Padrões de alocação de carbono estrutural e não estrutural em cinco espécies de lentilhas d'água (Lemnaceae) / Débora Pagliuso; orientador Marcos Silveira Buckeridge. -- São Paulo, 2018.

109 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Crescimento vegetal. 2. Carboidratos. 3. Parede celular. 4. Combustível alternativo. I. Buckeridge, Marcos Silveira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Débora Pagliuso

Título da Dissertação: Padrões de alocação de carbono estrutural e não estrutural em cinco espécies de lentilhas d'água (Lemnaceae)

Orientador (a): Prof. (a) Dr (a): Marcos Silveira Buckeridge

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **963/2018** referente ao projeto intitulado: ***"Padrão de alocação de carbono estrutural e não estrutural em cinco espécies de lentilhas d'água (Lemnaceae)"*** sob a responsabilidade de **Débora Pagliuso** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Marcos Silveira Buckeridge**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 20 de junho de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Aos meus pais, Edina e Cláudio, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela confiança, aceitação e imenso suporte durante não apenas aos anos dedicado a este trabalho.

Ao Dr. Marcos S. Buckeridge pela oportunidade, bem como, pela sua paciência e ensinamentos.

Ao Dr. Eric Lam pela disponibilização do material vegetal, ensinamentos de cultivo, verificações ortográficas de inglês e elucidações sobre minhas queridinhas plantas.

A Dra. Adriana Grandis pela imensa ajuda na concepção e na loucura de análise de dados.

A Dra Eny I.S. Floh pela confiança, provimento de infraestrutura e equipamentos para o cultivo *in vitro*.

A Eglee Igarashi pela amizade, ensinamentos de cultivo e ajuda com toda parte laboratorial.

As técnicas MSc.Amanda Ferreira Macedo, Silvia Regina Blanco e Viviane Costa pelo amparo e ajuda em momentos de perplexidade.

A Dra Carmen Palacios e ao Departamento de Fitoquímica pelos ensinamentos de novos protocolos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pena pelo amparo e enorme contribuição com verificações de metabólitos secundários que farão parte de um capítulo á parte deste trabalho.

Aos colegas do LAFIECO por deixarem o dia-a-dia mais colorido e divertido.

Ao Laboratório GaTE pelo uso de equipamentos.

Ao CNPq pelo fomento à pesquisa a partir da bolsa concedida (processo 133586/2016-2).

Ao INCT do Bioetanol pelo fomento á pesquisa a partir da bolsa concedida (processo 380641/2018-6).

A Pós-Graduação pelo amparo com documentos e pelo fomento da publicação do artigo.

RESUMO

PAGLIUSO, D. **Padrões de alocação de carbono estrutural e não estrutural em cinco espécies de lentilhas d'água (Lemnaceae)**. 2018. 101f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Lentilhas d'água são as menores angiospermas aquáticas monocotiledôneas, as quais são classificadas em duas subfamílias (Lemnoideae e Wolffioideae) que contemplam trinta e sete espécies representando cinco gêneros: *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia* (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; BORISJUK *et al.*, 2015; FAO, 1999; LANDOLT, 1992, LES *et al.*, 2002). Essas plantas apresentam rápida reprodução vegetativa o que implica no acúmulo acelerado de carboidratos e proteínas, que por sua vez, confere uma enorme aplicação industrial e biotecnológica, especialmente na bioenergia (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; FAO, 1999). O balanço de carbono no crescimento relaciona-se com a assimilação fotossintética, armazenamento e consumo desses compostos, que são influenciados pela intensidade de luz (SMITH; STITT, 2007; STITT; ZEEMAN, 2012). O maior dreno de carbono assimilado é para a síntese de parede celular e sacarose, portanto, conhecendo a composição dos polissacarídeos e suas interações junto com o conteúdo de carboidratos não estruturais impacta a produção de combustíveis alternativos. O presente trabalho visou quantificar e analisar os carboidratos estruturais (açúcares de parede celular – apiose, arabinose, fucose, ramnose, glicose, xilose, galactose e manose) e não estruturais (açúcares solúveis e de armazenamento – sacarose, frutose, rafinose, glicose e amido) de três espécies de Lemnoideae e duas Wolffioideae comparando com as taxas de crescimento dessas plantas.

Palavras chave: Crescimento vegetal. Carboidratos. Parede celular. Combustível alternativo.

ABSTRACT

PAGLIUSO, D. **Patterns of structural and non-structural carbon allocation in five species of duckweeds (Lemnaceae)**. 2018. 101f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Duckweeds are the smallest aquatic monocots classified in two subfamilies (Lemnoideae and Wolffioideae) that contemplates thirty-seven species representing five genera: *Spirodela*, *Lemna*, *Landoltia*, *Wolffia* and *Wolffiella* (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; BORISJUK *et al.*, 2015; FAO, 1999; LANDOLT, 1992, LES *et al.*, 2002). These plants display fast vegetative reproduction, which implies a rapid accumulation of carbohydrates and protein, conferring them biotechnological and industrial applications, especially in bioenergy (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; FAO, 1999). Carbon balance among growth is related to photosynthetic assimilation, storage, and consume of compounds which are influenced by light intensity (SMITH; STITT, 2007; STITT; ZEEMAN, 2012). The major sink of the carbon assimilated is to cell wall and sucrose synthesis, thereby knowing the polysaccharides composition and their interactions together with the non-structural carbohydrates content may impact the alternative fuels production. The present work aimed to quantify and comparative analyze structural (cell wall sugars – apiose, arabinose, fucose, rhamnose, glucose, xylose, galactose, and mannose) and non-structural (storage and soluble sugars – starch, sucrose, glucose, raffinose, and fructose) carbohydrates of three Lemnoideae and two Wolffioideae species correlating to its growth rates.

Key words: Plant grow. Carbohydrates. Cell wall. Alternative fuel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética da família <i>Lemnaceae</i>	18
Figura 2. Evolução do tamanho do genoma em <i>Lemnaceae</i>	19
Figura 3. Processo de senescência das lentilhas d'água a partir da redução do tempo de vida e tamanho celular.	22
Figura 4. Ciclo de vida de lentilhas d'água exemplificado por <i>S. polyrhiza</i>	23
Figura 5. Alocação do produto fotossintético triose-fosfato via ADP/UDP-glicose.....	25
Figura 6. Vias de síntese dos açúcares.....	27
Figura 7. Classes das pectinas.....	32
Figura 8. Fluxograma do trabalho desenvolvido na presente dissertação.....	35
Figura 9. Caracterização morfológica da família <i>Lemnaceae</i>	43
Figura 10. <i>Spirodela polyrhiza</i>	44
Figura 11. <i>Landoltia punctata</i>	44
Figura 12. <i>Lemna gibba</i>	44
Figura 13. <i>Wolffiella caudata</i>	45
Figura 14. <i>Wolffia borealis</i>	45
Figura 15. Comparação das taxas de crescimento relativo em cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob duas intensidades luminosas distintas (20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	47
Figura 16. Composição da biomassa de lentilhas d'água (<i>S. polyrhiza</i> , <i>L. punctata</i> , <i>L. gibba</i> , <i>W. caudata</i> e <i>W. borealis</i>) cultivadas em baixa (20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e alta (500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) intensidade luminosa.....	49

Figura 17. Análise comparativa do conteúdo de apiose nas paredes celulares de cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob duas intensidades luminosas (20 e 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	54
Figura 18. Análise de Componentes Principais (PC1 e PC2) de lentilhas d'água (<i>S. polyrhiza</i> , <i>L. punctata</i> , <i>L. gibba</i> , <i>W. caudata</i> e <i>W. borealis</i>) cultivadas sob duas intensidades de luz. (A) luz baixa (20 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) e (B) alta luz (500 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$).....	55
Figura 19. Conteúdo de lignina de cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob alta e baixa intensidade de luz. 20 e 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Espécies do estudo da caracterização da partição de carbono de lentilhas d'água.....37
- Tabela 2.** Conteúdo de carboidratos não estruturais (glicose, frutose, sacarose, rafinose e amido) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MS) de *Spirodela polyrhiza* (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC 128); *Wolffiella caudata* (9139) e *Wolffia borealis* (9144) cultivados sob alta luz ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e baixa luz ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....51
- Tabela 3.** Conteúdo de carboidratos estruturais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MS) de *Spirodela polyrhiza* (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC 128); *Wolffiella caudata* (9139) e *Wolffia borealis* (9144) cultivados sob alta luz ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e baixa luz ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

AIR - resíduo insolúvel a álcool (Alcohol insoluble residue)

AG- Arabinogalactanos

AP- apiogalacturonano

Api-apiose

Ara- arabinose

ATP – adenosina trifosfato

CO₂ – dióxido de carbono

Fru - frutose

Fuc- fucose

g- grama

Gal- galactose

GalA-ácido galacturônico

Glc- glicose

GlcA – ácido glucurônico

h - horas

ha - hectare

HG- Homogalacturonano

Kg – quilograma

L- litro

min - minutos

m - metro

M – molar

Man - manose

mM - milimolar

mg - miligramas

mL - mililitros

nM – nanomolar

MS- massa seca

NaOH- hidróxido de sódio

P- fosfato

Raf – rafinose

Rha - ramnose

RG-I- ramnogalacturonano tipo I

RG-II- ramnogalacturonano tipo II

TCR -taxa de crescimento relativo

TCR-MS - taxa de crescimento relativo de massa seca

TCR-F- taxa de crescimento relativo de número de frondes

s - segundos

Sac- sacarose

SH/2- Schenk Hildebrandt incompleto

Susy- sacarose sintase

t - tempo

TFA- ácido trifluoroacético

U – unidades

UDP – uridina difosfato

µg -microgramas

µL – microlitros

µm- micromolar

v- volume

XGA - xilogalacturonano

Xyl- xilose

LISTA DE SIGLAS

- HPAEC-PAD – Cromatografia de troca iônica com detector de pulso amperométrico
- ISCDRA - International Steering Committee on Duckweed Research and Applications
- LAFIECO- Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas
- PCA- Principal Analysis Component
- RDSC - Rutgers Duckweed Stock Cooperative

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1.	LENTILHAS D'ÁGUA	17
1.1.1.	Ciclo de vida	21
1.2.	METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS	24
1.3.	PAREDE CELULAR	28
1.3.1.	Parede celular de lentilhas d'água	33
1.4.	CONTEXTUALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	34
2	OBJETIVOS	36
2.1.	OBJETIVO GERAL	36
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1.	MATERIAL VEGETAL	37
3.2.	ACONDICIONAMENTO E PROCESSAMENTO VEGETAL	38
3.3.	IMAGENS LENTILHAS D'ÁGUA	38
3.4.	TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVA E TEMPO DE DUPLICAÇÃO	38
3.5.	OBTENÇÃO E ANÁLISE DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS	39
3.5.1.	Extração e análise de açúcares solúveis totais (AST)	39
3.5.1.1.	Método fenol-sulfúrico	39
3.5.2.	Dosagem de amido	40
3.5.3.	Extração de amido	40
3.6.	ANÁLISES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E LIGNINA	41
3.6.1.	Hidrólise e análise monossacarídeos neutros	41
3.6.2.	Determinação de ácidos urônicos	41
3.6.3.	Dosagem de lignina	42
3.7.	AMOSTRAGEM E ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS	43
4.1.	CARACTERIZAÇÃO Lemnaceae	43
4.2.	TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO (TCR)	45
4.3.	CARBOIDRATOS DE LENTILHAS D'ÁGUA	47
4.4.	CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS	50
4.5.	CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS	51
4.6.	LIGNINA	56
5	DISCUSSÃO	57

5.1. CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS E O CRESCIMENTO DE LENTILHAS D'ÁGUA	57
5.2. A PAREDE CELULAR E O CRESCIMENTO DE LENTILHAS D'ÁGUA	59
5.3. FLUXO DE CARBONO EM LENTILHAS D'ÁGUA.....	61
5.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: BIOENERGIA.....	63
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS	68
8. APÊNDICE	81
8.1. Apêndice 1 – Análise estatística da composição geral da biomassa de lentilhas d'água	81
8.2. Apêndice 2 - Manuscrito.....	82
9. ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1. LENTILHAS D'ÁGUA

Lentilhas d'água é o conjunto das menores angiospermas monocotiledôneas aquáticas flutuantes com capacidade de florir e formar densas populações clonais homogêneas. Convencionalmente os pesquisadores de lentilhas d'água utilizam a classificação destas espécies como pertencentes à família *Lemnaceae* (ISCDRA - *International Sterring Committee on Duckweed Research and Applications*, 2016).

As 37 espécies que compõe esse grupo vegetal são caracterizadas pelo tamanho reduzido e agrupadas em cinco gêneros: *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia* de acordo com suas características físico-morfológicas (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013). O gênero *Spirodela* (composto por apenas 2 espécies) é o mais ancestral enquanto que *Landoltia* (1 espécie), *Lemna* (13 espécies), *Wolffiella* (10 espécies) e *Wolffia* (11 espécies) são os mais derivados na ordem evolutiva (LES *et al.*, 2002). A família *Lemnaceae* é subdividida em duas subfamílias: *Lemnoideae* (*Spirodela*, *Landoltia* e *Lemna*) e *Wolffioideae* (*Wolffiella* e *Wolffia*) (LES *et al.*, 2002).

O cladograma da família *Lemnaceae* sugerido por Les *et al* (2002) (Figura 1) mostra a relação interespecífica confirmada pela análise de 4.700 caracteres que incluem dados de morfologia, anatomia, flavonóides, aloenzimas e sequências de DNA de cloroplastos (*rbcl* e *matK*) e introns (*trnK* e *rpl16*) em que *Landoltia*, *Lemna* e *Spirodela* formam um clado parafilético e *Wolffiella* e *Wolffia* um clado monofilético.

Figura 1. Árvore filogenética da família *Lemnaceae*.

Fonte: LES, D.H. *et al.* 2002. Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the duckweed family. Systematic Botany, v. 27, n.2, p.230.

O processo evolutivo neste grupo de espécies está relacionado com a sucessiva redução morfológica da família *Lemnaceae* e possivelmente, com o tamanho do genoma (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011). Com a redução estrutural dessas plantas parece ter havido um aumento em seu genoma, de tal forma que *Spirodela polyrrhiza* apresenta um genoma de 150 Mpb enquanto *Wolffia* tem 1.881 Mpb, tendo a ploidia ($2n = 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100-126$) como principal variação intrapopulacional (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011). Comparando com o modelo biológico *Arabidopsis thaliana*, cujo seu genoma têm cerca de 135 Mpb organizados em cinco cromossomos, *Spirodela*

se assemelha com menos de 20.000 genes codificantes, porém organizados em 20 cromossomos (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000).

A Figura 2 ilustra esse aumento inverso do tamanho genômico e as propriedades morfológicas das lentilhas d'água. Baseado na dimensão do genoma de *Spirodela polyrhiza* o gênero *Wolffia* corresponde a 12,6 vezes o tamanho de *Spirodela*, *Wolffiella* 6,5 vezes, *Lemna* 5 vezes, e *Landoltia* 2,4 vezes. Isso demonstra a enorme variabilidade do genoma com aumento de 13 vezes de *S. polyrhiza* para *Wolffia* (YU *et al.*, 2017).

Figura 2. Evolução do tamanho do genoma em *Lemnaceae*. Gráfico gerado a partir dos dados de Wang *et al.* (2011). O genoma aumentou significativamente (cerca de 12,6 vezes) da *Spirodela* (grupo ancestral) para o mais derivado *Wolffia*, tendo duplicação como principal variação intrapopulacional.

Como já mencionado, essas plantas são caracterizadas pelo tamanho reduzido e por sua estrutura composta de frondes arredondadas com uma ou duas juntas à base, sem diferenciação entre caule e folha e 0-21 raízes sem pelos radiculares (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; FAO, 1999; LANDOLT, 1992). O sistema vascular dessas plantas é reduzido e nas raízes são constituídos de um elemento traqueíde, dois elementos de vaso e seis células de parênquima floemáticas (KIM, 2007).

Uma vantagem das lentilhas d'água é sua habilidade de rápida adaptação à diversos ambientes, sem alterar suas características, assim permitindo uma distribuição mundial (BORISJUK *et al.*, 2015; FAO, 1999). Essa

ampla distribuição se deve também a capacidade de algumas espécies em formar turions. Turions são frondes compactas e reduzidas, repletas de grânulos de amido (LANDOLT, 1992), que permitem a sobrevivência dessas plantas à drásticas mudanças no microclima, tolerando assim vários tipos de estresse (e.g. temperaturas e salinidade) (APPENROTH; TELLER; HORN, 1996; OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2016; WANG; WU; MESSING, 2014). Os espaços de ar, chamados de aerênquima, estão presentes nas frondes e parecem ser responsáveis pela flutuabilidade dessas plantas. Quando são formados os turions, (com acúmulo de amido, que correspondem a 40-70% da biomassa) o aerênquima é reduzido e as plantas se tornam mais densas que a água afundando (APPENROTH; TELLER; HORN, 1996; OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2016; PERRY; APRIL, 1968; SMART; TREWAVAS, 1983; WANG; WU; MESSING, 2014). Pode-se dizer que este mecanismo fisiológico corresponde ao estado de dormência das *Lemnaceae*. Em condições propícias, as plantas consomem esse amido e saem do estado de dormência e voltam a flutuar (APPENROTH; TELLER; HORN, 1996; OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2016; PERRY; APRIL, 1968; SMART; TREWAVAS, 1983). Ainda, a formação dos turions estão envolvidos no ciclo de vida das lentilhas d'água (descrito no item 1.1.1), permitindo a sobrevivência aos períodos de congelamento das superfícies do ambiente aquático.

A reprodução vegetativa é rápida em condições adequadas, sendo que a biomassa é capaz de dobrar em 16-96 horas (APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; FAO, 1999). As lentilhas d'água são altamente sustentáveis pela capacidade de uso de água residuais como substrato nutricional (YADAV *et al.*, 2016). Essa rápida reprodução vegetativa proporciona o acúmulo de proteínas e carboidratos à curto prazo, conferindo importante potencial industrial e biotecnológico. Por sua vez, as aplicações se concentram em áreas de remediação de águas, bioenergia, produção de enzimas recombinantes, fatores proteicos, vacinas e biomateriais, ciclagem de carbono, testes de toxicidade, fonte proteica na alimentação humana ou animal e biofertilizantes (ALGIX, 2013; APPENROTH; BORISJUK; LAM, 2013; STOMP, 2005; WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011; WANG; WU; MESSING, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). É importante destacar que a biomassa contém nitrogênio na forma de proteína e aminoácidos livres, além de amido, o que intensifica ainda mais a aplicabilidade em processos

fermentativos destinados à bioenergia (YADAV *et al.*, 2016). Como também, pela combinação com tratamento de águas essa biomassa gerada pode ter aplicações rentáveis.

O conteúdo de carbono das lentilhas d'água é cerca de 40%. Por isto, estima-se que tenham capacidade de sequestrar entre 60 e 150 toneladas de dióxido de carbono de atmosfera por ha.ano⁻¹ (LANDOLT; KANDELER, 1987; YADAV *et al.*, 2016). A produtividade dessas plantas pode alcançar entre 80-100 toneladas de massa seca.ha⁻¹.ano⁻¹ (5 vezes maior que os obtidos para o milho), indicando uma biomassa considerável para bioprocessos (LAM *et al.*, 2014).

Além disso, as lentilhas d'água são consideradas um sistema ideal para a pesquisa, uma vez que (1) sua morfologia é reduzida e seu ciclo de vida é curto (LANDOLT, 1992, STOMP, 2005); (2) apresenta alta eficiência fotossintética (VERMA; SUTHAR, 2016); (3) crescimento rápido (LANDOLT, 1992, ZIEGLER *et al.*, 2015); (4) grande absorção nutritiva (STOMP, 2005); (5) fácil cultivo em condições axênicas, manipulação e coleta (WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011); (6) é transformável, passível de intercruzamento (STOMP, 2005, WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011) e (7) é propícia para estudos bioquímicos devido seu contato direto com meio de cultura (STOMP, 2005). Além disto, os sistemas que empregam lentilhas d'água têm vantagens por apresentarem baixos custos de manutenção e operação técnica (VERMA; SUTHAR, 2016).

Por todos estes motivos, as lentilhas d'água foram, de fato, o principal sistema modelo estudado antes de *Arabidopsis*, em especial o grupo *Lemna*, que foi responsável pela elucidação de resposta do fotoperíodo à floração (STOMP, 2005; WANG; KERSTETTER; MICHAEL, 2011).

A pequena quantidade de literatura científica sobre a composição de parede celular oculta aplicações adicionais de lentilhas d'água, bem como evidências evolutivas e compreensão da diversidade funcional das paredes celulares e sua distância evolutiva (LIEPMAN; CAVALIER, 2012; SILVA *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2014).

1.1.1. Ciclo de vida

Nas lentilhas d'água, o crescimento vegetativo apresenta períodos de senescência e rejuvenescimento de acordo com seus ciclos de vida, mesmo em condições climáticas e disponibilidade de nutrientes propícias para o

crescimento (FAO, 1999). Isso se deve à capacidade que essas plantas possuem em gerar novas frondes. Essas novas frondes apresentam uma massa menor devido à redução meristemática e celular, que conseqüentemente implica em um menor tempo de vida útil de acordo com sua ciclagem (WANGERMANN; ASHBY, 1950). O período de senescência ocorre quando o tempo de vida da fronde filha atinge metade da fronde de sua progenitora, isto é, quando as frondes filhas passam a ter metade da capacidade de sobrevivência (FAO, 1999; WANGERMANN; ASHBY, 1950). Portanto, há um processo de crescimento cíclico que funciona da seguinte forma: uma fronde apresenta uma expectativa de vida máxima de aproximadamente 40 dias (Figura 3). As frondes filhas desta irão apresentar um tempo da vida menor (33 dias). Conforme a reprodução clonal ocorre, este tempo de vida é gradualmente reduzido, até que a fronde mais tardia atinja um máximo de 10 dias de vida. Neste momento, parece ocorrer uma “reprogramação”, de forma que a sua descendente passa a ter tamanho e tempo de vida aumentados novamente, reiniciando o ciclo (Figura 3) (WANGERMANN; ASHBY, 1950). Este ciclo pode se repetir até 3 vezes, porém isto varia entre as espécies (WANGERMANN; ASHBY, 1950).

Figura 3. Processo de replicação e senescência das lentilhas d'água a partir da redução do tempo de vida e tamanho celular em *Spirodela polyrhiza*.

O ciclo de vida das lentilhas d'água pode ser exemplificado avaliando a espécie *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid, “a lentilha d'água gigante”. Pelas

características da *Spirodela*, o ciclo de vida pode ser descrito com três etapas principais (Figura 4), em que se tem (1) o crescimento vegetativo no verão, (2) formação de turions no outono e (3) germinação dos turions na primavera (APPENROTH, PALHARINI, e ZIEGLER; 2013; XYLÄNDER *et al.*, 1993).

Figura 4. Ciclo de vida de lentilhas d'água exemplificado por *S. polyrhiza*.

Fonte: imagem de formação de turion de W.P. Armstrong (2011) (<http://waynesword.palomar.edu/dckwdher2.htm>) e germinação de turion de C. C. Smart (2012) cedida a <https://www.mobot.org/jwcross/duckweed/flowering-dormancy.htm>.

As frondes da lentilha d'água gigante pode atingir até 1,5 cm, apresentando 2-5 frondes assimétricas em forma obovaladas a circular, arredondadas ou pontiagudas no ápice (LANDOLT, 1992; PLOTT, 2002). Normalmente a parte abaxial das frondes (epiderme inferior) apresenta antocianina conferindo uma coloração arroxeada. As frondes apresentam 7-21 nervuras e na porção prófilo (parte ventral da fronde) descendem 2 a 21 raízes (LANDOLT, 1992; PLOTT, 2002). As novas frondes e as flores se originam das duas bolsas laterais reprodutivas triangulares (LANDOLT, 1992). Por ser uma monocotiledônea aquática capaz de florir, esta pode apresentar frutos achatados, levemente alados e oriundos da flor feminina com 1-5 óvulos que podem ser fecundados pela flor masculina com antera bilocular (PLOTT, 2002). As sementes podem ser encontradas em número de 1-3 longitudinalmente estriadas (LANDOLT, 1992).

1.2. METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS

O crescimento vegetal é uma resposta a assimilação, armazenamento e consumo de carbono que por sua vez, está relacionado a disponibilidade de luz (SMITH; STITT, 2007; STITT; ZEEMAN, 2012). Consequentemente, os processos metabólicos envolvidos estão sujeitos a alterações em diversos níveis (FARRAR e WILLIAMS, 1991). Portanto, compreender algumas rotas que alteram o metabolismo de carboidratos é de extrema importância para entender como ocorre a alocação de carbono nas lentilhas d'água. Este conhecimento também permite relacionar o crescimento ao metabolismo relacionado à produção e consumo desses carboidratos.

Através do processo fotossintético, as plantas assimilam carbono (CO_2) e têm como o principal produto as trioses fosfato, que quando exportadas do cloroplasto para o citosol estão envolvidas na síntese de açúcares solúveis (glicose e frutose), oligossacarídeos solúveis (sacarose e rafinose), açúcares álcoois (inositol, sorbitol e manitol) e açúcares estruturais (CHAPIN *et al.*, 1990; HOCH *et al.*, 2003; LEEGOOD *et al.*, 2000; QUENTIN *et al.*, 2015). Alternativamente, as trioses podem ser mantidas no interior dos cloroplastos (estroma) para síntese de amido, atuando como uma reserva de carbono (LEEGOOD *et al.*, 2000). Esse amido será degradado no momento em que a fotossíntese é cessada e a planta passa a necessitar carbono para manter seus processos metabólicos durante o período noturno (SMITH; STITT, 2007; STITT; ZEEMAN, 2012).

A síntese de açúcares a partir da triose fosfato ocorre pelas vias ADP-Glc, e UDP-Glc (Figura 5). A via ADP-Glc ocorre no estroma do cloroplasto onde este será convertido ao açúcar de armazenamento amido, o qual pode ser eficientemente convertido em oligossacarídeos e glicose por endo e exo- α -1,4-glucanases que, então, poderão seguir pelas vias da glicólise ou pentose-fosfato (ZEEMAN, 2015). Já a via UDP-Glc (citossol) pode ser formada do produto do catabolismo de sacarose pela enzima sacarose sintase (SuSy) (ZEEMAN, 2015).

Figura 5. Alocação do produto fotossintético triose-fosfato via ADP/UDP-glicose em uma célula fotossintetizante do mesófilo foliar.

TPT- Transportados de Triose-P

As interconversões da via metabólica dos carboidratos sofrem desvios e redirecionamento de fluxo em situações de estresse (ROSA *et al.*, 2009). Os fluxos metabólicos são atrelados a *pools*, que são pontos da via onde há convergência de reações enzimáticas reversíveis em que seus intermediários assumem equilíbrio (ZEEMAN, 2015). Existem dois *pools* que coordenam o metabolismo dos carboidratos que são regulados a partir da demanda celular e de condições luminosas (ZEEMAN, 2015). O primeiro *pool* é composto de intermediários da via pentose fosfato (triose-P, gliceraldeído-3P, dihidroxiacetona-P, ribulose-5P, ribose-5P, xilulose-5P, sedoheptulose-7P, eritrose-4P e frutose-1,6P) e o segundo são hexoses fosfato (Glicose-1P, Glicose-6P e Frutose-6P) (ZEEMAN, 2015). O *pool* pentose fosfato está envolvido na síntese de ácidos orgânicos a partir da oxidação de triose-P na glicólise, na síntese de nucleotídeos pela ribose e na produção de lignina, polifenóis e aminoácidos a partir da via do chiquimato pelo intermediário eritrose-6P (ZEEMAN, 2015). Já o *pool* hexose fosfato está relacionado a intermediários da glicólise e da via oxidativa pentose fosfato. Portanto, está envolvido em processos de síntese de parede celular, amido, glicose, frutose e indiretamente no ciclo de Calvin-Benson e nas vias respiratórias da glicólise e da pentose-fosfato (ZEEMAN, 2015).

A síntese de sacarose é uma das vias do metabolismo de carboidratos de maior demanda, já que 80% do carbono assimilado fotossinteticamente é direcionado para a síntese desse açúcar e transportado pela planta (ROSA *et*

al., 2009). A sacarose pode ser clivada em glicose e frutose assumindo rotas de síntese de amido ou compostos estruturais da parede celular.

A síntese de parede celular é outra via significativa do metabolismo dos carboidratos (30%), já que grande parte do carbono fixado é atribuído a essas estruturas (ZEEMAN, 2015; POPPER, 2008).

Os açúcares de paredes são sintetizados a partir dos nucleotídeos açúcares, que por sua vez, são sintetizados a partir da frutose-6P (Figura 6). A frutose-6P, produto da glicólise, é responsável pela via GDP para a síntese de manose e fucose (BAR-PELED e O'NEILL, 2011). Enquanto que os demais açúcares de parede são sintetizados via UDP-glicose. O precursor UDP-glicose é formado a partir de glicose-1P pela UDP-glicose pirofosforilase (ZEEMAN, 2015). A UDP-glicose além de sintetizar celulose e glicose pode ser convertida aos nucleotídeos açúcares UDP-arabinose, UDP-ramnose, UDP-glucuronato e UDP-galactose, os quais servirão de substrato para a formação de outros nucleotídeo-açúcares e, finalmente, para a incorporação de monossacarídeos nos polímeros de parede celular (BAR-PELED e O'NEILL, 2011). O nucleotídeo açúcar UDP-glucuronato é o principal gargalo na síntese de pectinas, já que está envolvido na catálise de UDP-xilose, UDP-arabinose, UDP-ácido galacturônico e UDP-apiose (BAR-PELED e O'NEILL, 2011, VERBANCIC et al., 2017). Por outro lado, os componentes solúveis da biomassa são produtos fotossintéticos, os quais sacarose compreende no dissacarídeo frutose-glicose, e a rafinose, um trissacarídeo (frutose-glicose-galactose), sendo oriunda da sacarose e da UDP-Gal (Figura 6).

Tanto a síntese de parede quanto de açúcares não estruturais está imersa no *pool* de hexoses fosfato, no qual a partição dos fotoassimilados ocorre entre o açúcar de armazenamento (amido), os açúcares solúveis e estruturais (parede) (ZEEMAN, 2015).

Figura 6. Vias de síntese dos açúcares. Os componentes representados em preto são os precursores da síntese parede celular, enquanto que em vermelho são os monossacarídeos que formam os polissacarídeos representados em verde, azul e laranja (classes). Já a porção rosa representa os carboidratos não estruturais que foram avaliados neste estudo e cinza a via para síntese de lignina.

Abreviações: Fru – frutose, Glc-glicose, Sac- sacarose, Ara-arabinose, Api- apiose, Fuc-fucose, Gal – galactose, GlcA – ácido glucurônico, Man – manose, Rha – ramnose, GalA- ácido galacturônico, Xyl – xilose, RG I- ramnogalacturonano do tipo I, RG-II ramnogalacturonano do tipo II, XG – xiloglucano, HG – homogalacturonano, AP – apiogalacturonano e XGA – xilogalacturonano.

Fonte: Adaptações de Alonso *et al.* (2010), Verbancic *et al* (2017), vias metabólicas KEGG 00051 (metabolismo frutose e manose), 00052 (metabolismo galactose), 00500 (metabolismo amido e sacarose) e 00520 (metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo).

1.3. PAREDE CELULAR

A parede celular é uma estrutura que se forma do lado externo da membrana plasmática. Ela é composta de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos (COSGROVE, 2005; KALLURI e KELLER, 2010; SARKAR *et al.*, 2009). Essa estrutura pode também ser definida como um hidrogel, uma vez que as paredes são permeáveis à solutos aquosos de baixa massa molecular, apresentam troca iônica e efeito Donnan, ou seja, afetam a distribuição de cargas dos dois lados da membrana plasmática (JARVIS, 2011).

A função da parede celular vai além de conferir resistência mecânica e proteção (GILBERT, 2010). A parede é responsável por promover adesão celular, delimitar tamanho e volume das células vegetais, regular a condução de água e soluto e ainda determina relação entre a pressão de turgor e o volume celular, como também é fonte de moléculas sinalizadoras (BURTON *et al.*, 2010; COSGROVE, 2018; KALLURI; KELLER, 2010; McQUEEN-MASON e COSGROVE, 1994; WOLF *et al.*, 2012).

A codificação da parede celular para síntese, degradação e funções biológicas (defesa, resistência mecânica e comunicação) segue o código glicômico (BUCKERIDGE, 2018; BUCKERIDGE; DE SOUZA, 2014; TAVARES; BUCKERIDGE, 2015). Esse código pode ser espelhado ao código genético, em que os monossacarídeos são signos (como as bases nitrogenadas) que codificaram polímeros com diferentes arquiteturas que desempenharam funções específicas (BUCKERIDGE, 2017).

Diversos fatores abióticos (seca, alagamento, temperatura, salinidade, metais, irradiância de luz, poluição do ar e desequilíbrio de nutrientes) e bióticos (causada por infecção de patógenos) afetam o metabolismo de carboidratos das paredes celulares (GALL *et al.*, 2015; TENHAKEN, 2015). Assim, plantas cultivadas sob condições de baixa luz apresentam um maior afrouxamento e alongamento da parede celular por ação de enzimas de hemicelulose, enquanto que o aumento da irradiância causa espessamento da parede pelo incremento de celulose, hemicelulose e lignina e a luz UV inibe a elasticidade já que aumenta os teores de lignina e de ácidos hidroxicinâmicos que ligam os polímeros da parede (GALL *et al.*, 2015). Com isto, é importante caracterizar e elucidar a estrutura química de diversas espécies e grupos vegetais em relação à parede

celular, tanto por análises bioquímicas quanto no código glicômico em distintas condições de estresse (SARKAR *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos da parede (hemiceluloses, pectinas e celulose) estão descritos na forma de modelos de parede celular (ALBERSHEIM *et al.*, 2011; CARPITA e GIBEAUT, 1993). Um dos modelos mais aceitos denomina que os polímeros estão organizados formando domínios independentes: (1) celulose-hemicelulose, (2) pectinas e (3) proteínas, os quais interagem entre si e estão covalentemente ligados (O'NEILL e YORK, 2003). Internamente, as paredes são formadas por macro ou microfibrilas de celulose às quais hemiceluloses ficam aderidas. Este conjunto de polissacarídeos está embebido em uma matriz péctica (BUCKERIDGE *et al.*, 2015, BUCKERIDGE *et al.* 2017; CARPITA e GIBEAUT, 1993, COSGROVE, 2005).

A parede celular pode ser classificada como primária ou secundária. As paredes primárias são as expansíveis, constituídas de microfibrilas de celulose, hemiceluloses e pectinas as quais compreendem 90% de seu peso seco em polissacarídeos (FRY, 2004; BUCKERIDGE *et al.*, 2010; O'NEILL e YORK, 2003). O restante é caracterizado por possuir 2-10% de glicoproteínas estruturais, 1-5% de minerais, <2% de ésteres fenólicos e enzimas. Estes compostos estão dispostos e organizados por ligações covalentes e não covalentes (BUCKERIDGE *et al.*, 2010; O'NEILL e YORK, 2003; FRY, 2004; POGORELKO *et al.*, 2013, BUCKERIDGE *et al.*, 2018b). Já as paredes secundárias são aquelas que externamente as paredes primárias, através de deposição de macromoléculas (GIBEAUT; CARPITA, 1994; POGORELKO *et al.*, 2013; SALIBA *et al.*, 2001), como celulose nos vasos de xilema, xiloglucanos, mananos e galactanos como parede de reserva de sementes e lignina, um polímero que é depositado tardiamente e é encontrado principalmente em tecidos vasculares e epiderme (BUCKERIDGE, 2010b; MEENTS *et al.*, 2018; POGORELKO *et al.*, 2013; SALIBA *et al.*, 2001).

O termo genérico lignina remete a polímeros aromáticos complexos formados de ácido coniferílico, sinapílico e cumarílico que protegem os polissacarídeos da parede celular contra o ataque de patógenos (VANHOLME *et al.*, 2010). A lignina, embora não seja um carboidrato de parede celular, está relacionada diretamente a estes por apresentar interações com as macromoléculas de celulose e hemicelulose além de preencher espaços,

promovendo resistência mecânica na conversão da biomassa para a produção de biocombustíveis (JIN *et al.*, 2006, SHAZAD *et al.*, 2016, NISHIMURA *et al.*, 2018).

O crescimento vegetal está atrelado ao alongamento das células, que por sua vez, só é possível através de modificações nas propriedades físicas da parede celular primária (CARPITA, 1984, COSGROVE, 2005). Essas alterações estão na organização dos polímeros de parede celular, ocorrendo durante os processos de diferenciação e desenvolvimento do vegetal (CARPITA, 1984; GIBEAUT; CARPITA, 1994).

As paredes primárias ainda são subdivididas em três tipos de acordo com a predominância de cada um de seus domínios (pectinas, hemicelulose e celulose) (CARPITA e GIBEAUT, 1993; COSGROVE, 2005; YORK *et al.*, 1985). As paredes celulares do tipo I são características das eudicotiledôneas, apresentando xiloglucanos como principal hemicelulose (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Nas paredes do tipo I também são encontrados glucomananos, galactoglucomananos, galactomananos e glucuronoarabinoxilanos. (CARPITA e GIBEAUT, 1993; CARPITA e McCANN, 2000; McNEIL *et al.*, 1984, SMITH e HARRIS, 1999). Neste tipo de parede, as proporções entre os domínios da parede celular (pectinas, hemiceluloses e celulose) são quantitativamente equivalentes. Já as paredes do tipo II são comumente encontradas nas *Poaceae* (gramíneas) que apresentam o arabinoxilano como principal hemicelulose, tendo teores pectinas e xiloglucanos reduzidos (CARPITA; GIBEAUT, 1993; CARPITA, 1996). Já na parede do tipo III, comum em alguns grupos de pteridófitas, os mananos são as principais hemiceluloses e o teores de pectinas também são reduzidos (SILVA *et al.*, 2011).

A síntese de celulose ocorre na membrana plasmática através de complexos terminais de seis rosetas, enquanto que os demais componentes da parede, excluindo calose, são sintetizadas no complexo de Golgi e são secretados para a superfície celular através de vesículas, na qual irão formar uma matriz porosa atrelada as microfibrilas de celulose (CARPITA, 2011; GIBEAUT; CARPITA, 1994; KIMURA *et al.*, 1999; ROUDIER *et al.*, 2005; SOMMERVILLE, 2006). A calose, por sua vez é homopolímero de glicose β -1 $\rightarrow$ 3 que pode apresentar ramificações β -1 $\rightarrow$ 6 o qual está envolvido nos estágios de desenvolvimento do pólen, divisão celular, regulação do movimento de

moléculas célula-a-célula como também seu depósito na célula serve como resposta a injúrias, infecção por patógenos e estresses fisiológicos (CHEN e KIM, 2009). A sua síntese (calose) também ocorre a partir do precursor UDP-glicose, porém sendo tecido específico (NEDUKHA, 2015).

A celulose (maior componente das paredes celulares) é um polímero linear composto de monômeros de β -D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4 organizados em fibrilas (IVAKOV *et al.*, 2017; KALLURI e KELLER, 2010; KEEGSTRA, 2010; LI *et al.*, 2014).

As hemiceluloses são polissacarídeos que apresentam ligações glicosídicas β -1,4-piranosil na cadeia principal de maneira a formar heteromananos, xiloglucanos, heteroxilanos e glucano de ligação mista com distintas combinações dos monossacarídeos arabinose, manose, xilose, fucose e glicose (GOMEZ *et al.*, 2008; O'NEILL; YORK, 2003; PAULY *et al.*, 2013). Os mananos são formados por polímeros de manose ligados glicosidicamente (β -1 $\rightarrow$ 4) que podem ser ramificados formando glucomananos (manose e glicose), galactomananos (manose e galactose) e galactoglucomananos (manose, galactose e glicose) (MARCUS *et al.*, 2010; SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005; WHISTLER e CHEN, 1991). Os xiloglucanos são constituídos de unidades repetitivas formadas por resíduos β -D-glicosil contendo α -D-xilosil na posição C-6, que por sua vez apresenta as ramificações com galactose e fucose (FRY, 1989; PAULY *et al.*, 2000; SCHELLER & ULVSKOV, 2010). Os xilanos são formados por cadeias de xilose ligadas β -1,4 com distintas substituições de ácido glucurônico (glucuronoxilano), arabinose (arabinoxilano), acetil ou uma combinação de ácidos 4-O-metil éter, ferúlico acético e *p*-cumárico (RENNIE e SCHELLER, 2014; SAHA, 2003; YORK e O'NEILL, 2008). Os glucanos de ligação mista são polissacarídeos de cadeias glicose β -1,4 intercalado com ligações β -1,3 únicas comumente encontrados em gramíneas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004, CARPITA, 1996; SMITH e HARRIS, 1999, SORENSEN *et al.*, 2008; URBANOWICZ *et al.*, 2004).

Há também o domínio das pectinas que se encontra entre os polímeros de hemicelulose e a celulose, mas que aparentemente não tem ligação com os mesmos. As pectinas são polissacarídeos que apresentam cadeia principal de ácidos galacturônicos, os quais representam 70% de sua composição (HARHOLT *et al.*, 2010; MOHNEN, 2008). Existem cinco classes de pectinas em

1.3.1. Parede celular de lentilhas d'água

As lentilhas d'água são monocotiledôneas não-comelinóides caracterizando sua parede celular como rica em pectinas e xiloglucanos (AVCI *et al.*, 2017). De fato, a composição das lentilhas d'água tem sido relatada com elevados teores de pectinas (ZHAO *et al.*, 2014), baixa hemicelulose (ZHAO *et al.*, 2014; GE *et al.*, 2012), traços de lignina (<5%) (TAO *et al.*, 2013; BLAZEY; MCCLURE, 1968) e a celulose constituindo cerca de 44% da parede celular (*Lemna minor*) (ZHAO *et al.*, 2014). Pouco se sabe sobre as hemiceluloses dessas plantas.

As pectinas se destacam nas lentilhas d'água pelo fato de possuírem baixo teor de metil-esterificação (HG), o que conferem a essas plantas a capacidade de agregar poluentes nessas estruturas (KRZESLOWSKA *et al.*, 2016). Além disso, ramnogalacturonanos, arabinogalactanos, xilogalacturonanos e apiogalacturonanos são encontrados. Os apiogalacturonanos são encontrados apenas nas plantas aquáticas *Zoostera* e *Lemnaceae* (HART; KINDEL, 1970; MØLHØJ; VERMA; REITER, 2003; VENKETACHALAM *et al.*, 2013; MOHNEN, 2008).

Os apiogalacturonanos estão envolvidos na diversificação das lentilhas d'água, de tal forma que o grupo das lemnoideis apresentam elevados teores desse composto enquanto que as wolffioides apresentam substituição dessas pectinas ricas em apiose por xilogalacturonanos (AVCI *et al.*, 2017).

Na maioria das plantas a apiose é encontrada em diversos metabólitos secundários em oposição ao seu papel estrutural na parede celular (HART e KINDEL, 1970). A apiose é um açúcar de cinco carbonos ramificado com álcoois terciários que podem assumir quatro formas furanose isoméricas (PIČMANOVÁ e MØLLER, 2016). Além de estar presente nos apiogalacturonanos das lentilhas d'água, a apiose é encontrada em menores proporções no polissacarídeo péptico RG-II, onde serve como sítio de ligação para o borato (MØLHØJ; VERMA; REITER, 2003). O borato é responsável pela união de duas cadeias de RG-II formando dímeros nas paredes de angiospermas, pteridófitas e licófitas que acabam limitando o tamanho, propriedades mecânicas e porosidade das paredes primárias (CAMACHO-CRISTÓBAL; REXACH; GONZÁLEZ-FONTES, 2008; MIWA; FUJIWARA, 2010; MØLHØJ; VERMA; REITER, 2003; O'NEILL *et*

al., 2004). Ainda, a apiose tem se mostrado como agente crioprotetor, protetor de estresse oxidativo, defesa contra patógenos e com molécula sinalizadora (PIČMANOVÁ e MØLLER, 2016).

OVODOVA *et al.* (2000) detectou um polissacarídeo que foi denominado por estes autores como lemnano (oriundo da *Lemna minor* L.). Este polímero é formado por ácido galacturônico, apiose, galactose, arabinose e xilose que caracterizam α -1,4-D-galacturonano e um apiogalacturonano ramificado com cadeia principal de resíduos ácidos α -1,4-D-galactopiranosilurônico pouco esterificados que poderiam ser apenas apiogalacturonanos modificados.

As pectinas estão relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da plantas, morfogênese, adesão e expansão celular, porosidade de parede, proteção a fatores externos e interações iônicas (COSGROVE, 2018; DEMARTY; MORVAN; THELLIER, 1978; HARHOLT *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2015). No que diz respeito à bioenergia, os tamanhos dos poros determinados pelas pectinas limitam a ação de enzimas que resultam em menores liberações de açúcares fermentáveis. Portanto, pectinases devem ser incluídas em coquetéis enzimáticos de pré-tratamentos (GRANDIS *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2015). Ainda, mutantes de *Arabidopsis* com redução de pectinas metil-esterificadas quando submetidas a sacarificação enzimática apresentam aumento da eficiência do processo (LIONETTI *et al.*, 2010).

A conversão da biomassa lignocelulósica é considerada difícil e dispendiosa devido a recalcitrância que é consequente das características estruturais (CUI; CHENG, 2015; HIMMEL *et al.*, 2007). A recalcitrância pode estar relacionada com uma resposta co-evolutiva e de resistência à patógenos e herbívoros, tornando essa biomassa resistente à hidrólise (BUCKERIDGE *et al.*, 2015; RIDLEY *et al.*, 2001). Esperar-se-ia, portanto, que uma baixa concentração de hemiceluloses e lignina presentes nas lentilhas d'água lhes confeririam uma biomassa menos recalcitrante e possivelmente mais sacarificável para a produção de biocombustíveis.

1.4. CONTEXTUALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

As lentilhas d'água podem ser apontadas como auxiliares na produção de biomassa para bioenergia, uma vez que têm crescimento acelerado, acumulando biomassa rapidamente. Além disto, seu cultivo pode ser feito ao

mesmo tempo em que ocorre a remediação de águas. Condições de manejo e cultivo simples permitem compreender aspectos básicos da fisiologia relacionados à produção de alimentos, cosméticos, biorefinaria e demais aplicações biotecnológicas.

No âmbito bioenergético, quanto maior a taxa de crescimento e acúmulo de carboidratos fermentáveis, maior será a viabilidade na produção de biomassa. Portanto, avaliar a composição de açúcares não estruturais (etanol de primeira geração) e estruturais (parede celular-etanol de segunda geração) permitiu uma abordagem holística da biomassa vegetal das lentilhas d'água. Ainda, a partição de carbono na forma de carboidratos estruturais e não estruturais, está diretamente relacionada às condições bióticas e abióticas em que as plantas estejam crescendo.

Pensando nisso, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar uma avaliação comparativa dos carboidratos estruturais e não estruturais de *Spirodela polyrhiza*, *Landoltia punctata*, *Lemna gibba*, *Wolffiella caudata* e *Wolffia borealis*. Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1) taxas de crescimentos em duas intensidades luminosas distintas e 2) conteúdo de carboidratos não estruturais e estruturais em duas condições de cultivo.

O fluxograma das etapas de desenvolvimento está na Figura 8.

Figura 8. Fluxograma do trabalho desenvolvido na presente dissertação.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a taxa de crescimento e conteúdo de carboidratos de *S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* e *W. borealis* cultivadas sob estresse de luz.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar taxa de crescimento de cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob 20 e 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
- b. Determinar o perfil de açúcares solúveis totais nas lentilhas d'água estudadas.
- c. Quantificar o conteúdo de amido nas lentilhas d'água estudadas.
- d. Determinar o conteúdo de ácidos urônicos da parede celular das lentilhas d'água.
- e. Analisar o conteúdo monossacarídeos total da parede.
- f. Realizar estudo comparativo entre os parâmetros mencionados entre as plantas cultivadas em baixa e alta luz.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

As espécies alvo de estudo *Spirodela polyrhiza* (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC 128), *Wolffiella caudata* (9139) e *Wolffia borealis* (9144) foram cultivadas em meio Schenk-Hildebrandt incompleto (SH/2) (anexo 1) acrescido de 0,5 % de sacarose (pH 6,5). O material biológico (lentilhas d'água) foi cedido ao grupo coordenado pelo Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge pelo pesquisador Dr. Eric Lam do laboratório Lam da Universidade Estadual de Nova Jersey, Rutgers, da Escola de Ciências Biológicas e do Meio Ambiente do Departamento de Patologia e Biologia de Plantas. Os números de identificação de quatro dígitos seguidos das designações das espécies são específicos para a Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC) e estão relacionados ao ecótipo de local de aquisição e confirmação da espécie, os “códigos” aqui empregados estão exemplificados na Tabela 1. O cultivo foi conduzido de forma axênica, à 25°C, 16 horas claro e 8 horas escuro com intensidade luminosa 20 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As intensidades de luz foram determinadas na altura das plantas com o medidor de fotossíntese IRGA Li-Cor 6400XT equipado com câmara fluorométrica de folha. Para analisar a resposta do estresse luminoso sob a composição de carboidratos foram empregados dois pontos extremos, sendo que a baixa intensidade de luz 20 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ compreendeu na situação de estresse enquanto que a alta intensidade de luz 500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi o controle. A alta intensidade de luz foi o controle pelo fato de que estas plantas crescem em plena luz, tendo alta disponibilidade energética. Também é importante ressaltar que a predisposição genética dessas plantas em recorrência ao seu ecótipo podem influenciar os dados gerados.

Tabela 1. Espécies do estudo da caracterização da partição de carbono de lentilhas d'água.

Identificação	Espécie	Ecótipo
9509	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Alemanha, Lotschen, Stadtroda
7624	<i>Landoltia punctata</i>	Israel, Tel Aviv
DWC 128	<i>Lemna gibba</i>	Japão, Toki
9139	<i>Wolffiella caudata</i>	Brasil, Amazonas, Manaus
9144	<i>Wolffia borealis</i>	Estados Unidos, Michigan

3.2. ACONDICIONAMENTO E PROCESSAMENTO VEGETAL

O cultivo axênico foi realizado em erlenmeyers fechados com tampa de alumínio e a coleta foi conduzida quando as plantas formaram uma lâmina cobrindo toda a área do frasco a partir de uma filtragem em nylon (aproximadamente 3-4 semanas). O material vegetal foi acondicionado em folhas de alumínio, as quais foram submetidas a congelamento em nitrogênio líquido e freezer. O material para análise de carboidratos foi então seco em liofilizador (L101- Liotop) e submetido a pulverização pelo equipamento GenoGrinder (Spex-Sample Prep 2010).

3.3. IMAGENS LENTILHAS D'ÁGUA

Imagens das espécies estudadas foram confeccionadas em lupa Leica M205 FA acoplada com camera Leica DFC 700 T a partir do software Leica Application Suite (LAS) v.4.8.0 para representação gráfica das lentilhas d'água.

3.4. TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVA E TEMPO DE DUPLICAÇÃO

Segundo a ISCDRA, a taxa de crescimento relativa (TCR) deve ser mensurada como foi descrito por Ziegler *et al.* (2015) e outros.

A TCR foi mensurada empregando 8 réplicas para cada espécie com o intuito de avaliar diferenças no crescimento bem como ter um delineamento experimental mais preciso. Após o pré-cultivo de mês do material vegetal nas condições já descritas, 10-20 frondes de *Spirodela polyrhiza*, *Landoltia punctata* e *Lemna gibba* e 20-50 frondes de *Wolffiella caudata* e *Wolffia borealis* foram selecionadas ao acaso e inoculadas em um novo erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL de SH/2 suplementado. Quatro réplicas no dia zero cultivo (t_0) foram coletadas, o material vegetal foi envolto em papel alumínio e seco a 100°C overnight para determinação da massa seca inicial (m_{0s}). Após sete dias de cultivo (t_7), as quatro réplicas cultivadas foram coletadas, e o número de frondes (f) foram determinados assim como a massa seca (m_{7s}).

As taxas de crescimento foram determinadas com os valores dos dois parâmetros avaliados: número de frondes (f) e massa seca (MS). A taxa de crescimento relativa (TCR) foi calculada empregando a equação I, que pode ser simplificada na equação II, sendo X o conjunto dos dados obtidos dos

parâmetros avaliados (f ou MS) e t os pontos de tempo analisados, neste caso podendo ser t_0 ou t_7 .

$$X_t = x_{t_0} * e^{TCR*t} \quad (I)$$

$$TCR = \frac{\ln x_{t_7} - \ln x_{t_0}}{t_7 - t_0} \quad (II)$$

3.5. OBTENÇÃO E ANÁLISE DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS

3.5.1. Extração e análise de açúcares solúveis totais (AST)

Os carboidratos não estruturais foram avaliados para que se pudesse ter uma relação desses em contrapartida dos carboidratos estruturais.

Os açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose e rafinose) foram extraídos quatro vezes de 20 mg de massa seca pulverizada com 1,5 mL de 80% (v/v) de etanol a 80°C por 20 minutos cada sob agitação. Centrifugou-se a solução a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante contendo o AST foi coletado para análises posteriores. Verificações da presença de açúcares remanescentes foram realizadas com o sobrenadante no término das extrações pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico. O resíduo obtido, denominado AIR (do inglês Alcohol Insoluble Residue) foram secos a 40°C.

Os açúcares solúveis extraídos foram secos em condensador a vácuo rotativo (SpeedVac) (ThermoScientific Savant SC 250 EXP), ressuspendido em 1 mL de água e 1 mL de clorofórmio (para remoção de pigmentos lipossolúveis) e centrifugados a 13.000 g por 10 minutos. A porção aquosa (açúcares) foi recuperada e analisados por cromatografia de troca iônica com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em sistema Dionex (ICS 5000) empregando a coluna CarboPac PA1 eluída com hidróxido de sódio 150 µM em uma corrida isocrática de 27 minutos.

3.5.1.1. Método fenol-sulfúrico

O método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) consiste na confecção de uma curva padrão de glicose 5 µL-50 µL para um volume final de 500 µL de água. A uma quantidade padronizada das amostras completada com água (para chegar em 50 µL) foram adicionados 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico 95-97%. Após resfriamento da reação, a leitura no espectrofotômetro (ThermoScientific Genesys 10S UV-VIS) com absorbância a 490 nm foi

realizada, empregando etanol 80% ou água como branco para inferência da presença/ausência de AST nas amostras.

3.5.2. Dosagem de amido

Dentre os carboidratos não estruturais, o amido merece uma análise específica devida sua característica de reserva bem como sua importância na produção de biocombustíveis de primeira geração, além dos relatos de teores altos deste em lentilhas d'água.

A dosagem de amido foi conduzida seguindo o descrito por Amaral *et al.* (2007). Para a dosagem de amido foram usados o material previamente submetido à extração de açúcares solúveis, AIR. O AIR foi tratado com 120 U.mL⁻¹ de α -amilase (E.C. 3.2.1.1) de *Bacillus licheniformis* (Megazyme®) diluído em tampão MOPS 10 mM (pH 6,5) a 75°C por 1 hr. A incubação seguiu com adição de 30 U.mL⁻¹ de amiloglucosidase (E.C. 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (Megazyme®) diluída em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5) a 50°C por 1 hr. As reações foram paradas por congelamento. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação. O amido foi dosado a partir de 5 μ L do sobrenadante diluído em 45 μ L de água deionizada, seguido da adição de 250 μ L de GODPOD (Glicose PAP liqueform- Labtests) e incubação de 15 minutos a 30°C. O teor de glicose livre foi determinado por espectrofotômetro acoplado a leitor de microplacas de ELISA (ThermoScientific Multiskan FC) em comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão foi realizada com glicose (Sigma—Aldrich) nas concentrações de 0,02-0,2 mg.mL⁻¹.

3.5.3. Extração de amido

Para as análises de carboidratos estruturais, o material isento de açúcares solúveis foi submetido a extração de amido com 120 U.mL⁻¹ de α -amilase (E.C. 3.2.1.1) como descrito no item 3.5.2. O sobrenadante foi descartado. Os resíduos foram lavados 3 vezes com etanol 80%, e seco a 40°C para análises de parede.

3.6. ANÁLISES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E LIGNINA

Os carboidratos estruturais representam a composição da parede celular vegetal em si, compreendendo no domínio das pectinas, celulose e hemicelulose. Com o conhecimento da parede celular das lentilhas d'água, muitas aplicações poderão ser extendidas, melhoradas e identificadas, ainda podendo transcender para demais modelos de estudos.

3.6.1. Hidrólise e análise monossacarídeos neutros

A partir da composição de monossacarídeos é possível inferir polissacarídeos de parede pela combinação e identificação desses açúcares base. Os monossacarídeos foram obtidos por hidrólise ácida a quente com ácido trifluoroacético (TFA). Da parede celular obtida (AIR isento de amido), 5 mg foram hidrolisadas em microtubos com 1 mL TFA 2M por 1h a 100°C em termobloco. Em seguida, o conteúdo foi seco em condensador (Thermo Scientific Savant SC 250 EXP). As amostras secas foram ressuspensas em 1 mL de água miliQ seguido de filtração em filtros de 0,22 µm (Merk Millipore).

Os monossacarídeos foram analisados por cromatografia de troca iônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em coluna CarboPac SA10 (sistema ICS 5000, Dionex-Thermo®) eluída isocraticamente com 99,2% de água e 0,8% (v/v) de hidróxido de sódio (1 mL.min⁻¹). Os monossacarídeos liberados foram identificados pela adição de eluente pós-coluna NaOH 500mM (0,5 mL.min⁻¹). Os padrões usados para identificação de açúcares foram apiose, arabinose, galactose, glicose, fucose, manose, ramnose e xilose. O procedimento seguiu o descrito por De Souza *et al.* (2013) e Leite (2013).

3.6.2. Determinação de ácidos urônicos

O conteúdo de ácidos urônicos foi determinado pelo ensaio colorimétrico empregando m-hidroxibifenil e ácido galacturônico (1 mg.mL⁻¹) como padrão baseado no relatado por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991) para a estipulação indireta do conteúdo de pectinas. Para a dosagem destes é necessário a realização de hidrólise ácida de 5 mg de parede celular tratada (sem amido). Essa hidrólise consistiu em duas reações com 1 mL de ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos em gelo sob agitação. Seguida de duas reações de

0,5 mL de água miliQ em gelo sob agitação (500 rpm-mesa agitadora Labnet Orbit 3000). As amostras foram diluídas até atingirem um volume final de 10 mL e o sobrenadante foi recuperado por centrifugação de 10 minutos a 2.000 g. Já o ensaio colorimétrico foi conduzido com 400 µL da hidrólise, 40 µL de ácido sulfâmico de potássio 4M (pH 1,6), 2,4 mL de tetraborato de sódio 75 nM em ácido sulfúrico, seguido de homogeneização em vórtex e incubação a 100°C por 20 minutos. As reações foram resfriadas em gelo por 10 minutos e adicionadas 80 µL de m-hidroxibifenil 0,15% (m/v) em hidróxido de sódio aquoso 0,5% (m/v). A mistura foi homogeneizada em vórtex e ficou em repouso por 10 minutos para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 525 nm.

3.6.3. Dosagem de lignina

Trinta miligramas da biomassa de lentilhas d'água foram homogeneizadas em 50 mM fosfato de potássio e centrifugadas. O precipitado foi submetido a sucessivas lavagens e centrifugações. Foram empregadas três lavagens com tampão fosfato, três com triton X 1%, duas em cloreto de sódio 1M em tampão fosfato, duas com água destilada e duas com acetona 100%. O material obtido foi seco em estufa a 45°C. O teor de lignina foi mensurado pelo método acetil bromida descrito por Fukushima *et al.* (2015), o qual consiste em adicionar 500 µL de acetil bromida 25% às amostras isentas de proteínas e aquecer a 70°C sob agitação por 30 minutos. Seguido de resfriamento das amostras em banho de gelo, e adição de 1 mL ácido acético glacial. Dessa solução foram retirados 200 µL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo para o ensaio colorimétrico. Neste foram adicionados 200 µL de hidróxido de sódio 1,5 M; 150 µL de cloridrato de hidroxilamina 0,5 M e 750 µL de ácido acético glacial. A absorbância foi lida a 280 nm.

3.7. AMOSTRAGEM E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados produzidos foram obtidos de quatruplicatas e foram representados com médias e erro padrão. As análises estatísticas foram conduzidas a partir da submissão dos dados à análise de variância one-way (ANOVA) com teste post-hoc Tukey ($p < 0,005$) para comparação entre as cinco espécies estudadas ou por teste-t de Student para avaliar o efeito da luz pelo software estatístico JMP 5.1.

4 RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO Lemnaceae

As lentilhas d'água são classificadas em cinco gêneros com características morfológicas bem distintas no que diz respeito à presença de raízes e tamanho de frondes. A imagem a seguir (Figura 9) representa a família *Lemnaceae*, ressaltando a redução morfológica dentre os gêneros *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia*. Enquanto que a sequência de Figuras (10, 11, 12, 13 e 14) mostra as espécies *Spirodela polyrhiza* (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC 128), *Wolffiella caudata* (9139), *Wolffia borealis* (9144) em maiores detalhes.

Figura 9. Caracterização morfológica da família *Lemnaceae*. Os cinco gêneros (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia*) apresentam redução e perda de órgãos durante o processo evolutivo, no qual *Spirodela* é considerada a lentilha d'água gigante (1,6 cm), *Landoltia* (0,9 cm) e *Lemna* (0,8 cm) são as intermediárias, enquanto que *Wolffiella* (0,3 cm) assume uma estrutura de elipse e sem raízes. Já *Wolffia* (0,2 cm) é o gênero mais reduzido também sem raízes e com frondes de formato obovado.

Figura 10. *Spirodela polyrhiza*. A imagem a esquerda mostra uma população desse tipo vegetal enquanto que a direita mostra *Spirodela polyrhiza* em maior aumento.

Figura 11. *Landoltia punctata*. A imagem a esquerda caracteriza uma população dessa enquanto que a imagem da direita representa *Landoltia punctata* (7624) em maiores detalhes.

Figura 12. *Lemna gibba*. A espécie *Lemna gibba* é exemplificada na imagem a direita, enquanto que a imagem a esquerda representa a visão abaxial da mesma, podendo-se avaliar a raiz.

Figura 13. *Wolffiella caudata*. Figura a esquerda representa a espécie *Wolffiella caudata* durante o seu crescimento, em que se há a formação de pequenas populações que permanecem muitas vezes unidas, já a imagem à direita exemplifica um indivíduo único.

Figura 14. *Wolffia borealis*. Figura a esquerda representa uma população da espécie *Wolffia borealis*, e a direita se tem um maior aumento da mesma.

4.2. TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO (TCR)

Avaliando as TCR entre as espécies cultivadas a intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em relação a massa seca (Figura 15 A) e ao número de frondes (Figura 15 B), as espécies Wolffioideae avaliadas (*W. caudata* e *W. borealis*) apresentaram uma taxa de crescimento inferior ($0,1-0,14 \text{ mg.dia}^{-1}$) que as espécies de Lemnoideae avaliadas no presente estudo ($0,14-0,24 \text{ mg.dia}^{-1}$).

Por outro lado, quando se avaliam os efeitos da alta intensidade luminosa ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a TCR baseada no número de frondes (Figura 15 D) continua seguindo o padrão verificado para baixa luz (Figura 15 A e B) em que as Wolffioideae tendem a crescer mais lentamente quando comparadas a Lemnoideae. Isto ocorre de tal forma que *S. polyrhiza* apresenta uma taxa de

crescimento mais elevada ($0,28 \text{ mg.dia}^{-1}$), seguida de *L. punctata* ($0,25 \text{ mg.dia}^{-1}$) e *L. gibba* ($0,25 \text{ mg.dia}^{-1}$). Já *W. caudata* ($0,15 \text{ mg.dia}^{-1}$) e *W. borealis* ($0,19 \text{ mg.dia}^{-1}$) tiveram uma redução significativa em seu crescimento, o que consequentemente impacta no seu tempo de duplicação. Enquanto que o parâmetro de massa seca (Figura 15 C) se iguala entre as duas subfamílias nas cinco espécies avaliadas. Isso indica que a alta luz, fez com que as Wolffioideae aumentassem a sua biomassa pelo acúmulo amido (o qual será descrito mais a frente), tornando o parâmetro de crescimento dessas semelhante ao acúmulo de biomassa por crescimento das Lemnoideae.

Como esperado, o aumento da intensidade luminosa levou ao aumento das taxas de crescimento (Figura 15). Nas Lemnoideae o aumento foi de 81,5%, sendo em *S. polyrhiza* 53,9%, em *L. punctata* 42,7%, e em *L. gibba* 147,9%. Enquanto que na *W. caudata* o aumento foi de 203,4% e em *W. borealis* 218,6%.

Figura 15. Comparação das taxas de crescimento relativo em cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob duas intensidades luminosas distintas ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os valores estão representados pela média aritmética $\pm$ erro padrão avaliado por massa seca em mg.dia^{-1} (A e C) e por número de frondes (B e D). Os painéis A e B mostram resultados obtidos em baixa luz e C e D em alta luz. As médias seguidas de letras distintas são estatisticamente significativas entre as espécies comparadas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3. CARBOIDRATOS DE LENTILHAS D'ÁGUA

A partir dos dados obtidos da extração de açúcares solúveis e amido foi possível avaliar o conteúdo da biomassa em relação a esses, como também ao conteúdo de parede celular e proteínas, compostos fenólicos e proteínas (últimos perdidos durante o processamento). Portanto, a composição da biomassa de

cada espécie de lentilhas d'água cultivadas a $20 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ e $500 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ de intensidade luminosa estão representadas na Figura 16. De modo geral, representando apenas os carboidratos, a biomassa é composta de 17,1% de açúcares solúveis, 6,4% amido e 47,9% as paredes celulares (Figura 16). Os demais compostos (lipídios, proteínas e metabólitos secundários – denominamos outros) contaram para 28,6% da biomassa das espécies de lentilhas d'água estudadas (Figura 16).

As lentilhas d'água cultivadas sob baixa luz apresentaram diferença entre as espécies no conteúdo de parede celular e amido, enquanto que as cultivadas em alta luz tiveram modificações no conteúdo determinado como outros (Apêndice 1). O estresse de baixa luz fez com que as lentilhas d'água acumulassem mais açúcares solúveis e menores teores de parede celular (Figura 16, Apêndice 1, Tabela 2).

Figura 16. Composição da biomassa de lentilhas d'água (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* e *W. borealis*) cultivadas em baixa ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e alta ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) intensidade luminosa. Valores representados pela média das porcentagens de massa seca. Açúcares solúveis são representados pela soma do conteúdo de sacarose, frutose, rafinose e glicose. A parede celular representa a porção residual do AIR isento de amido. O conteúdo de outros representam metabólitos secundários, lipídios e proteínas que não foram mensurados no presente estudo.

4.4. CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS

Os carboidratos não estruturais avaliados no presente estudo foram glicose, frutose, sacarose, rafinose e amido, os quais estão apresentados na Tabela 2. Somando os valores dos açúcares glicose, frutose, sacarose e rafinose têm-se o conteúdo de açúcares solúveis totais do material vegetal. O menor conteúdo de açúcares solúveis das plantas cultivadas sob baixa luz ocorre em *L. punctata* (7,02 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS), seguido de *W. caudata* (8,85 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS). *W. borealis* (11,68 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS), *L. gibba* (12,08 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) e *S. polyrhiza* (17,21 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) (Tabela 2). O conteúdo de açúcares solúveis quando as lentilhas d'água foram cultivadas sob intensidade luminosa de 500 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ é maior em *W. borealis* (35,13 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) e *L. gibba* (25,21 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS), enquanto que nas espécies *W. caudata* (22,04 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS), *L. punctata* (16,85 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) e *S. polyrhiza* (15,04 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) são menores. O aumento nos teores de açúcares solúveis foi significativo para *L. punctata* e *L. gibba* (Apêndice 1).

Como resposta ao tratamento de baixa luz, os açúcares sacarose, rafinose e amido se diferenciaram entre as cinco espécies estudadas. Em *S. polyrhiza* os teores de frutose foram 63 vezes maiores que nas demais espécies, enquanto que *W. caudata* mostrou incremento de 8 vezes do teor de rafinose (Tabela 2). Por outro lado, o amido tende a ser mais elevado nas espécies de Wolffioideae. A espécie *L. punctata* apresentou 18,5% do conteúdo de amido de *S. polyrhiza* e *L. gibba* (Lemnoideae) (Tabela 2). Ainda, o conteúdo de glicose em *L. punctata* é 37% menor que das demais espécies, denotando uma diferença significativa no conteúdo de carboidratos não estruturais sob estresse luminoso.

Já em resposta a alta intensidade de luz, os açúcares sacarose e rafinose aumentaram em 261%, enquanto que frutose e glicose reduziram 36% nas Lemnoideae e aumentaram nas Wolffioideae (62% incremento glicose e 114% frutose) (Tabela 2). Apenas *W. caudata* não teve os conteúdos de glicose e rafinose reduzidos significativamente (Tabela 2). Ainda, a alta luz induziu o acúmulo de amido por parte das Wolffioideae (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo de carboidratos não estruturais (glicose, frutose, sacarose, rafinose e amido) ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) de *Spirodela polyrhiza* (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC 128), *Wolffiella caudata* (9139) e *Wolffia borealis* (9144) cultivados sob alta luz ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e baixa luz ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão ($n=4$). O p-valor (coluna) representa o efeito da luz estipulado do teste-t de Student para $p<0,05$ e em negrito estão os estatisticamente significativos. Enquanto que o p-valor (linha) representa a comparação entre as espécies a partir de ANOVA-one way seguida de teste de Tukey para $p>0,05$, onde as letras em linha representam diferenças entre as espécies por açúcar avaliado.

		<i>S. polyrhiza</i>	<i>L. punctata</i>	<i>L. gibba</i>	<i>W. caudata</i>	<i>W. borealis</i>	P-valor
Glicose	Baixa luz	$5,03 \pm 2,11^{ab}$	$2,64 \pm 0,40^b$	$6,10 \pm 2,19^{ab}$	$4,00 \pm 0,45^{ab}$	$5,12 \pm 1,04^a$	0,019
	Alta luz	$2,66 \pm 0,19^b$	$1,63 \pm 0,17^b$	$4,54 \pm 0,55^{ab}$	$2,40 \pm 0,25^b$	$12,38 \pm 4,84^a$	0,019
	P	0,306	0,061	0,515	0,020	0,193	
Frutose	Baixa luz	$6,51 \pm 3,01^{ab}$	$4,33 \pm 0,72^b$	$5,67 \pm 2,14^{ab}$	$3,99 \pm 0,41^{ab}$	$6,37 \pm 1,19^a$	0,016
	Alta luz	$2,89 \pm 0,32^b$	$1,84 \pm 0,19^b$	$5,80 \pm 0,72^{ab}$	$5,19 \pm 0,87^b$	$17,03 \pm 5,83^a$	0,008
	P	0,276	0,015	0,953	0,259	0,124	
Sacarose	Baixa luz	$5,47 \pm 2,21$	$0,04 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	0,310
	Alta luz	$8,81 \pm 0,65^{bc}$	$6,48 \pm 0,50^{bc}$	$11,02 \pm 0,58^{ab}$	$14,26 \pm 2,25^a$	$5,66 \pm 0,22^c$	0,000
	P	0,198	0,000	0,000	0,001	0,000	
Rafinose	Baixa luz	$0,22 \pm 0,10^a$	$0,01 \pm 0,01^b$	$0,21 \pm 0,11^{ab}$	$0,89 \pm 0,12^a$	$0,02 \pm 0,01^b$	0,006
	Alta luz	$0,68 \pm 0,08^c$	$6,90 \pm 0,51^a$	$3,85 \pm 0,53^b$	$0,19 \pm 0,06^c$	$0,12 \pm 0,03^c$	0,000
	P	0,011	0,000	0,001	0,002	0,018	
Amido	Baixa luz	$55,23 \pm 13,88^a$	$11,97 \pm 0,69^b$	$74,04 \pm 23,61^a$	$66,49 \pm 18,77^a$	$94,71 \pm 21,94^a$	0,054
	Alta luz	$32,95 \pm 1,98^b$	$18,56 \pm 3,19^b$	$6,88 \pm 0,21^b$	$106,88 \pm 20,61^a$	$171,54 \pm 27,67^a$	0,000
	P	0,163	0,090	0,029	0,198	0,073	

4.5. CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS

A análise de carboidratos estruturais compreende a avaliação do conteúdo de parede celular. Foram verificadas duas tendências do efeito da luz em relação a parede celular: 1) o conteúdo de ácidos urônicos foram reduzidos nas espécies estudadas, com exceção de *L. punctata*; 2) todos os monossacarídeos, com exceção de manose e glucose reduziram nas *Lemnnoideae* enquanto que nas *Wolffioideae* tiveram incremento (Tabela 3).

Os ácidos urônicos podem ser encontrados na parede celular vegetal como ácido galacturônico (maior componente de componentes pécticos) e ácido glucurônico (componente de arabinoxilanos – hemicelulose) (AHMED; LABAVITCH, 1977). Sendo assim, sua dosagem expressa indiretamente o teor de pectinas na parede celular. A análise realizada com a parede celular de *Lemnaceae* sem amido (Tabela 3) demonstra que espécies mais derivadas (*W. caudata* e *W. borealis*) apresentam maiores conteúdos de ácidos urônicos quando cultivadas sob baixa luz ($203,59 \mu\text{g.mg}^{-1}$). Por outro lado, esse conteúdo

foi reduzido significativamente em 64,8% ($131,95 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) quando *Wolffioideae* foram cultivadas em alta luz. Como já mencionado, o conteúdo de ácidos urônicos de *L. punctata* se distingue das demais espécies. Tanto é que quando cultivada sob baixa intensidade de luz os teores correspondem a 35% das outras lentilhas d'água. Com o aumento de luz o conteúdo de ácidos urônicos em *L. punctata* aumentou em 160% ($66,98 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ para $174,51 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) concomitante com redução de fucose e arabinose, indicando hipoteticamente o aumento de homogalacturonanos em sua parede celular (Tabela 3).

A proporção encontrada de ácidos urônicos representa 69% dos carboidratos avaliados da parede celular, enquanto que os monossacarídeos arabinose, fucose, manose, ramnose, xilose, glicose, galactose e apiose contam 31% (Tabela 3). Desconsiderando os ácidos urônicos, os açúcares arabinose, galactose, xilose e apiose são os majoritários correspondendo a 84% em baixa luz e 79,2% em alta luz (Tabela 3).

As proporções médias de monossacarídeos das lentilhas d'água quando cultivadas sob baixa intensidade luminosa correspondem a 23,8% arabinose, 2,2% fucose, 17,8% galactose, 6,7% glicose, 3,5% manose, 4,7% ramnose, 26,4% xilose e 16,0% apiose (dados calculados a partir da representação do açúcar na somatória dos monossacarídeos (sem ácidos urônicos) apresentados na Tabela 3). Alternativamente, quando cultivadas sob maior intensidade luminosa, as proporções de monossacarídeos foram de 21,8% arabinose, 1,6% fucose, 15,9% galactose, 13,7% glicose, 2,1% manose, 3,8% ramnose, 24,6% xilose e 16,9% apiose.

Considerando as proporções de arabinose, os arabinanos poderiam representar 16,5% da parede celular. Já os xilanos 22%. Nas *Wolffioideae* ($20,4 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$) o conteúdo de xilose é mais elevado que nas *Lemnoideae* ($16,4 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$) o que se torna mais evidente quando avalia-se apenas alta luz (Tabela 3). Ainda entre as hemiceluloses, os mananos representariam cerca de 2%, enquanto os xiloglucanos são mais difíceis de calcular, pois são compostos de glicose, xilose, galactose e fucose que são monossacarídeos ocorrem paralelamente em outros polímeros.

A porção neutra das pectinas, computada a partir dos teores de galactose, ramnose, apiose correspondem a 37,6%. Mas é preciso lembrar que há também arabinose, que acima foi computada para os arabinanos. Só se

poderá distinguir a arabinose oriunda de arabinanos e arabinosilanos e pectinas após hidrólise enzimática com xilanase. E ainda, a galactose pode ser constituinte de galactanos e galactomananos.

Tabela 3. Conteúdo de carboidratos estruturais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MS) de *Spirodela polyrhiza* (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC 128); *Wolffiella caudata* (9139) e *Wolffia borealis* (9144) cultivados sob alta luz ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e baixa luz ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão ($n=4$). O p-valor (coluna) representa o efeito da luz estipulado do teste-t de Student para $p<0,05$ e em negrito estão os estatisticamente significativos. Enquanto que o p-valor (linha) representa a comparação entre as espécies a partir de ANOVA-one way seguida de teste de Tukey para $p>0,05$, onde as letras em linha representam diferenças entre as espécies por açúcar avaliado.

		<i>S. polyrhiza</i>	<i>L. punctata</i>	<i>L. gibba</i>	<i>W. caudata</i>	<i>W. borealis</i>	p-valor
Ácidos urônicos	Baixa luz	184,96 $\pm$ 17,64 ^a	66,98 $\pm$ 5,85 ^b	169,86 $\pm$ 18,18 ^a	180,36 $\pm$ 17,53 ^a	226,82 $\pm$ 33,34 ^a	0,001
	Alta luz	127,57 $\pm$ 12,73	174,51 $\pm$ 18,79	143,77 $\pm$ 16,41	140,65 $\pm$ 36,66	123,24 $\pm$ 14,33	0,912
	P	0,038	0,002	0,061	0,045	0,147	
Fucose	Baixa luz	1,54 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,21	0,98 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,06	1,42 $\pm$ 0,16	0,112
	Alta luz	1,14 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,53 $\pm$ 0,13 ^b	0,67 $\pm$ 0,02 ^b	1,25 $\pm$ 0,25 ^{ab}	1,74 $\pm$ 0,27 ^a	0,017
	P	0,026	0,039	0,002	0,497	0,343	
Apiose	Baixa luz	7,27 $\pm$ 0,90 ^b	19,47 $\pm$ 3,61 ^a	15,80 $\pm$ 0,75 ^a	3,61 $\pm$ 0,71 ^b	1,94 $\pm$ 0,27 ^b	0,000
	Alta luz	5,42 $\pm$ 0,34 ^c	14,64 $\pm$ 0,72 ^a	10,16 $\pm$ 1,13 ^{ab}	7,00 $\pm$ 1,85 ^{bc}	3,23 $\pm$ 0,36 ^c	0,000
	P	0,102	0,237	0,006	0,138	0,029	
Xilose	Baixa luz	8,47 $\pm$ 0,38 ^c	23,20 $\pm$ 4,48 ^a	18,26 $\pm$ 0,73 ^{ab}	13,92 $\pm$ 0,78 ^{bc}	15,98 $\pm$ 0,65 ^{abc}	0,001
	Alta luz	6,94 $\pm$ 0,31 ^b	12,63 $\pm$ 4,03 ^{ab}	14,57 $\pm$ 1,86 ^{ab}	24,33 $\pm$ 5,39 ^a	27,19 $\pm$ 4,20 ^a	0,007
	P	0,020	0,123	0,115	0,104	0,039	
Arabinose	Baixa luz	11,57 $\pm$ 1,02 ^b	10,34 $\pm$ 1,91 ^b	6,17 $\pm$ 0,15 ^b	28,76 $\pm$ 4,72 ^a	14,46 $\pm$ 0,65 ^b	0,000
	Alta luz	9,78 $\pm$ 0,71 ^{bc}	4,03 $\pm$ 1,10 ^c	5,64 $\pm$ 0,48 ^c	39,05 $\pm$ 7,02 ^a	23,80 $\pm$ 3,23 ^{ab}	0,000
	P	0,203	0,028	0,335	0,269	0,030	
Galactose	Baixa luz	13,80 $\pm$ 0,77	12,78 $\pm$ 2,62	8,91 $\pm$ 0,20	9,96 $\pm$ 0,89	8,68 $\pm$ 0,73	0,069
	Alta luz	11,63 $\pm$ 0,81	6,96 $\pm$ 2,22	8,35 $\pm$ 0,61	11,60 $\pm$ 2,19	11,61 $\pm$ 1,87	0,196
	P	0,101	0,141	0,420	0,515	0,196	
Ramnose	Baixa luz	3,88 $\pm$ 0,24 ^a	3,26 $\pm$ 0,70 ^{ab}	2,36 $\pm$ 0,08 ^{ab}	1,72 $\pm$ 0,14 ^b	2,40 $\pm$ 0,21 ^{ab}	0,001
	Alta luz	3,23 $\pm$ 0,18	1,69 $\pm$ 0,53	1,88 $\pm$ 0,17	2,31 $\pm$ 0,58	2,37 $\pm$ 0,33	0,113
	P	0,073	0,123	0,049	0,364	0,949	
Glicose	Baixa luz	3,39 $\pm$ 0,44	3,05 $\pm$ 0,45	3,02 $\pm$ 0,71	5,07 $\pm$ 0,81	4,74 $\pm$ 1,46	0,462
	Alta luz	9,02 $\pm$ 1,08 ^{abc}	2,96 $\pm$ 0,92 ^c	4,76 $\pm$ 1,30 ^{bc}	14,27 $\pm$ 3,49 ^{ab}	17,96 $\pm$ 3,95 ^a	0,003
	P	0,003	0,931	0,284	0,042	0,020	
Manose	Baixa luz	1,95 $\pm$ 0,16 ^b	8,63 $\pm$ 1,78 ^a	0,91 $\pm$ 0,07 ^b	1,35 $\pm$ 0,17 ^b	1,76 $\pm$ 0,21 ^a	0,000
	Alta luz	1,50 $\pm$ 0,26	0,91 $\pm$ 0,26	1,15 $\pm$ 0,08	1,42 $\pm$ 0,30	1,55 $\pm$ 0,28	0,366
	P	0,195	0,005	0,061	0,846	0,568	

Diferentemente, o conteúdo do açúcar apiose é encontrado em grandes concentrações nas lentilhas d'água merecendo uma avaliação mais profunda. Sabe-se que os teores desse açúcar, em especial da pectina apiogalacturonano, é diferente nas subfamílias Lemnoideae e Wolffioidae (AVCI *et al.*, 2017). As espécies da subfamília Lemnoideae tendem a apresentar maiores teores de apiose do que as Wolffioidae (Tabela 3) o que corrobora com a literatura. Com o aumento da intensidade de luz, as Wolffioidae aumentaram apiose em 184% (de 2,77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para 5,11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Tabela 3, Figura 17) enquanto que as

Lemnoideae reduziram o conteúdo em 71% (de 14,18 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para 10,07 $\mu\text{g.g}^{-1}$) (Tabela 3, Figura 17).

Figura 17. Análise comparativa do conteúdo de apiose nas paredes celulares de cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob duas intensidades luminosas (20 e 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Dados representados pela média $\pm$ erro padrão. Letras maiúsculas representam diferença significativa avaliadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para baixa luz. Letras em minúsculo são significativamente distintas em relação a alta luz no teste de Tukey ($p < 0,05$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa pelo teste-t de Student ($p < 0,05$) para as cinco espécies nas duas intensidades de luz.

A análise de componentes principais (Figura 18) utilizando todas as variáveis, revelou que os teores de amido e apiose estão negativamente correlacionados. No caso de baixa luz, isso se deve a maior capacidade de crescimento de *S. polyrhiza* (Figura 18 A), que poderia ser a razão para a clara separação das demais espécies (PC2). No entanto, sob alta luz (Figura 18 B), as espécies de Lemnoideae que possuem maior conteúdo de apiose se propagam mais rapidamente (TCR-F), enquanto que as espécies de Wolffioideae cresceram mais lentamente (TCR-F), concomitante com maiores teores de amido.

A

B

Figura 18. Análise de Componentes Principais (PC1 e PC2) de lentilhas d'água (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* e *W. borealis*) cultivadas sob duas intensidades de luz. (A) luz baixa ($20 \mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) e (B) alta luz ($500 \mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Xilose, apiose, manose, arabinose, glicose, galactose e ramnose são monossacarídeos relacionados à parede celular, os ácidos urônicos são um componente das pectinas e algumas hemiceluloses. Amido e açúcares solúveis representam carboidratos não estruturais, e TCR (Taxa de Crescimento Relativo) com base no número de frondes (TCR-F) e na massa seca (TCR-MS). (n = 4).

4.6. LIGNINA

O conteúdo de lignina é considerado relativamente baixo devido a características morfofisiológicas (WANG *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). As lentilhas d'água são pouco lignificadas e como pode ser visualizado pela Figura 19 a lignina representa em média 3% da parede celular quando as lentilhas d'água são cultivadas sob baixa luz. Já quando as plantas foram cultivadas sob alta luz o conteúdo de lignina teve um aumento para 3,3% sendo significativo para *L. punctata*, *L. gibba* enquanto que para *W. borealis* a redução foi significativa.

Figura 19. Conteúdo de lignina de cinco espécies de lentilhas d'água cultivadas sob alta e baixa intensidade de luz. 20 e 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Dados representados pela média $\pm$ erro padrão. Letras maiúsculas representam diferença significativa avaliadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para baixa luz. Letras em minúsculo são significativamente distintas em relação a alta luz no teste de Tukey ($p < 0,05$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa pelo teste-t de Student ($p < 0,05$) para as cinco espécies nas duas intensidades de luz.

5 DISCUSSÃO

5.1. CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS E O CRESCIMENTO DE LENTILHAS D'ÁGUA

Os açúcares são fundamentais para a energética celular, estrutura, transporte, reconhecimento de superfície, além de integrar parte da composição do material genético (LALONDE *et al.*, 1999). Além disso, o metabolismo de carboidratos é essencial para o desenvolvimento vegetal. A síntese de paredes celulares, após a síntese de sacarose e amido, é um dos maiores drenos do carbono fixado através da fotossíntese denominando está uma grande biomassa.

A subfamília *Lemnaceae* tem sido estudada devido à amplitude de aplicações e por apresentar conteúdo proteico alto, baixos teores de fibra e lignina, alta capacidade de absorção de compostos minerais, além de características propícias para cultivo (CULLEY; EPPS, 1973). Sendo assim, é de grande valia a verificação de alocação de carbono nessas plantas.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que existem diferenças entre as subfamílias *Lemnoideae* e *Wolffioideae* quanto ao crescimento, teor de amido, composição de açúcares solúveis e componentes da parede celular. As lentilhas d'água avaliadas parecem seguir o padrão estabelecido para a maioria das espécies vegetais, em que os teores de amido se correlacionam com as maiores taxas de crescimento (SCHULTZE *et al.*, 1991; SULPICE *et al.*, 2009; ZEEMAN, 2015). Foi verificado que as espécies de *Lemnoideae* diferem de *Wolffioideae* por apresentarem taxas de crescimento mais elevadas e relativamente menores teores de amido (Figura 15, Tabela 2). As espécies *Wolffioideae* apresentaram limitação de crescimento em comparação com as *Lemnoideae* quando cultivadas em alta luz (Figura 15 D). Porém, o aumento da taxa fotossintética para as *Wolffioideae* correspondeu a um aumento na biomassa devido ao maior acúmulo de amido. Isso fez com que essas plantas ficassem mais pesadas, igualando a biomassa de maior número de frondes das *Lemnoideae* (Figura 15 C). Além disso, é conhecido que as lentilhas d'água apresentaram uma correlação positiva de acúmulo de amido com fotoperíodo, intensidade luminosa e correlação negativa com

disponibilidade de fósforo e nitrogênio no sistema de cultivo (YIN *et al.*, 2015; XIAO *et al.*, 2013).

Os dados revelam uma possível limitação no crescimento por parte das Wolffioideae. Esta limitação parece não estar relacionada apenas à disponibilidade de luz e ao acúmulo de amido, mas também ao controle interno de alocação de carbono e/ou capacidade fotossintética (Figura 15).

Açúcares não estruturais são produtos fotossintéticos que auxiliam no crescimento e metabolismo do vegetal, refletindo no conteúdo de carboidratos e de energia das plantas (QUENTIN *et al.*, 2015; XIU; HUANG; LIU, 2009). Uma proporção baixa de açúcares não estruturais, indica um consumo mais alto em funções fisiológicas básicas essenciais como respiração e fotossíntese (HOCH *et al.*, 2003; QUENTIN *et al.*, 2015). Se o fluxo de carbono para o crescimento for alto, mais células serão produzidas, levando à maior produção de parede celular e menor acúmulo de carboidratos não estruturais, como a sacarose e o amido. As biomassas das cinco espécies de lentilhas d'água estudadas neste trabalho apresentaram um aumento no conteúdo de açúcares solúveis sob alta luz (11,2%), sendo significativo para *L. punctata* e *L. gibba* (Tabela 2, Figura 16, Apêndice 1). O aumento dos carboidratos não estruturais nas plantas cultivadas sob alta luz se deve provavelmente pelo aumento do acúmulo dos açúcares primários decorrente do aumento da taxa fotossintética (GORDON *et al.*, 1980).

Os produtos primários da fixação de carbono (amido e sacarose) são comumente avaliados para verificar relações de fonte-dreno, uma vez que o amido age como depósito intermediário para os fotoassimilados, enquanto que a sacarose é responsável pela distribuição do carbono via floema nos vegetais (SONNEWALD; WILLMITZER, 1992). Foi verificado nas lentilhas d'água que as plantas cultivadas sob alta intensidade de luz levaram-nas a sintetizarem maiores teores de sacarose ($9,25 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) (Tabela 2). Sendo assim, o conteúdo de sacarose supriria o acúmulo de amido, salvo nas espécies Wolffioideae. Nas Wolffioideae a partição de carbono foi deslocada para a síntese de amido. Hipoteticamente, o excesso de carbono no sistema das Wolffioideae decorrente da exportação excedida da sacarose modificou a direção do pool hexose fosfato, uma vez que essas plantas não estão demandando tanto sacarose quanto as Lemnoideae pela sua divisão clonal mais lenta.

A relação entre o conteúdo de açúcares solúveis (UDP-glicose) e amido (ADP-glicose) para as cinco espécies estudadas foram diferentes. Tanto é que as Wolffioideae acumularam mais amido, como também aumentaram o conteúdo de carboidratos não-estruturais em alta luz (Figura 6, Tabela 2, Apêndice 1). Enquanto que as Lemnoideae não apresentaram grande fluxo de carbono da via ADP-glicose para a síntese de amido.

Uma observação deve ser dada para *Landoltia punctata*, uma vez que essa não seguiu o padrão observado para as demais lentilhas d'água. Essa espécie apresentou 18,5% do conteúdo de amido das Lemnoideae ($11,97 \mu\text{g.mg}^{-1}$ contra $64,63 \mu\text{g.mg}^{-1}$) (Tabela 2). Isso possivelmente está relacionada ao fato de que a intensidade luminosa pode não ter sido suficiente para elevar a taxa fotossintética muito acima do ponto de compensação de luz desta espécie, levando assim a um fluxo de carbono muito baixo, perto do limite mínimo para dar suporte ao crescimento.

A biomassa das lentilhas d'água têm sido relatadas na literatura com maiores proporções de compostos solúveis, o que contrasta com as proporções relativamente baixas de carboidratos estruturais (XU *et al.* 2011; XIAO *et al.* 2013; YIN *et al.* 2015; LI *et al.* 2016). Porém, os dados do presente trabalho não confirmam estas observações, já que revelam que os carboidratos estruturais (parede celular) compõem quase metade da biomassa em todas as espécies analisadas (Figura 16).

5.2. A PAREDE CELULAR E O CRESCIMENTO DE LENTILHAS D'ÁGUA

A parede celular, como já mencionado, é considerada como um dos principais drenos do metabolismo dos carboidratos, assumindo 30% desse (ZEEMAN, 2015). Portanto, a capacidade de ativar e desativar a síntese de parede celular é de vital importância, uma vez que se tem demandas celulares diferenciadas (IVAKOV *et al.*, 2017). Estudos avaliando a incorporação de glicose em polímeros de parede em *Arabidopsis* revelam que durante a noite têm-se uma redução na incorporação de elementos na parede celular (BOEX-FONTVIELLE *et al.*, 2014). A produção de componentes da parede celular (pectinas e hemiceluloses) está relacionada ao consumo do fluxo metabólico, assim como seu transporte por vesículas e exocitose (IVAKOV *et al.*, 2017). Estes processos estão ligados a respostas ecofisiológicas das plantas pelo fato

de grande parte do carbono assimilado fotossinteticamente ser incorporado na parede celular (POPPER, 2011).

As paredes de lentilhas d'água apresentam altas proporções de pectinas (AVCI *et al.*, 2017). Dentre elas estão os apiogalacturonanos, que foram relatados como característicos dessas plantas (DUFF, 1965; HART e KINDEL, 1970). Os apiogalacturonanos são polissacarídeos que apresentam a pentose apiose, ramificando a cadeia principal formada por ácidos galacturônicos. Avci *et al* (2017) investigaram as pectinas de 12 espécies de lentilhas d'água e verificaram que a diversificação dessas plantas levou as Wolffioideae a uma redução no conteúdo de apiogalacturonanos nas paredes celulares, enquanto que um outro tipo de pectina, o xilogalacturonano foi aumentada. A xilose, além de ser constituinte dos polissacarídeos pécnicos xilogalacturonanos e ramnogalacturonanos pode ser também encontrada em xilanos, xiloglucanos e arabinoxilanos (GUYETT *et al.* 2009; BAR-PELED *et al.*, 2012).

O conteúdo de xilose tem sido relatado em baixas proporções nas lentilhas d'água (GE *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2014). Porém, no presente estudo verificamos que o conteúdo de xilose representa cerca de 22% da parede celular ($16,54 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$), sendo relativamente menor em Lemnoideae (0,68 vezes) em comparação com Wolffioideae (1,7 vezes) quando cultivadas sob alta luz (Tabela 3 e Figura 18).

Com relação à apiose, esta parece estar relacionada à capacidade de assimilação de boro (MATOH, 1997) pela complexação deste micronutriente nas paredes celulares (FEISCHER *et al.*, 1998; MATSUNAGA *et al.*, 2004). O boro é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal, pois está envolvido no transporte de açúcares, síntese de parede celular, xilema e floema, lignificação, manutenção da estrutura da parede celular, metabolismo de carboidratos, metabolismo de RNA, respiração, metabolismo de ácido indol-acético, metabolismo de fenol, formação de gemas apicais, síntese de ácido nucléico e proteínas, função de membrana e envolvimento no citoesqueleto e processos envolvendo esse (MATOH *et al.*, 1997; CAMACHO-CRISTOBÁL *et al.*, 2015; BLEVINS; LUKASZEWSKI, 1998). O boro foi, portanto, fundamental, na evolução de plantas vasculares assim como na formação da pectina RG-II (O'NEILL *et al.*, 2004; GOLDBACH; WINNER, 2007).

O boro (em excesso – concentrações acima de 10 mg.L^{-1}) está relacionado negativamente com a taxa de crescimento e produção de biomassa em algumas lentilhas d'água (BÖCÜK *et al.*, 2013; DAVIS *et al.*, 2002; GLANDON e McNABB, 1977; GÜR *et al.*, 2016; TÜRKER *et al.*, 2017). Porém, o boro em condições normais não age diretamente sobre o crescimento acelerado das lentilhas d'água, mas parece ser o responsável pela modificação no conteúdo de parede dessas plantas. A baixa disponibilidade de boro na água provavelmente funcionou como fator seletivo durante a evolução, de forma que muitas das lentilhas d'água incorporaram mais apiose na sua parede celular, o que as possibilitou complexar esse micronutriente essencial para o garantir o desenvolvimento e metabolismo. A apiose pode ser encontrada nos polímeros RG-II das plantas em geral, enquanto que o apiogalacturonano parece ser exclusivo de algumas plantas aquáticas, como é o caso das lentilhas d'água e *Zostera* (HART e KINDEL, 1970; MOHNEN, 2008). Hipoteticamente a presença de apiogalacturonanos em lentilhas d'água poderia ser considerada uma adaptação evolutiva para disseminação e sobrevivência em seu habitat, uma vez que os ambientes aquáticos ($\text{boro}=0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) apresentam uma concentração de boro 2000 vezes menor que em ambientes terrestres ($\text{boro}=2-200 \text{ mg.L}^{-1}$) (BÖCÜK *et al.*, 2013). Ainda, as ligações cruzadas reduzidas em RG-II (decorrente da deficiência de apiose) relaciona-se com a diminuição do crescimento das plantas (ISHII *et al.*, 2001). Com isto, a concentração de boro foliar ou de parede se correlaciona positivamente com ácidos urônicos, ramnose e galactose (HU *et al.*, 1996). Entretanto, a estrutura e interligações de RG-II nas Lemnoideae e Wolffioideae é bastante conservada (AVCI *et al.*, 2017), o que corrobora com a pouca variação do açúcar ramnose em resposta a luz (Tabela 3). Todas estas observações sugerem que, de fato, os apiogalacturonanos estejam de alguma forma envolvidos no crescimento das lentilhas d'água.

5.3. FLUXO DE CARBONO EM LENTILHAS D'ÁGUA

Com a maior disponibilidade de fótons levando ao aumento da eficiência fotossintética, e conseqüentemente a maior disponibilidade de carbono (YIN *et al.*, 2015) fez com que nas Wolffioideae o fluxo de carbono foi direcionado a via ADP-Glc para a síntese de amido, enquanto que nas Lemnoideae a via UDP-Glc foi estimulada para a síntese de parede celular e açúcares solúveis (Figura 6,

Tabela 2 e 3). A relação entre crescimento e o acúmulo do amido, hipoteticamente, parece estar associada com os teores de apiose na parede celular, os quais são maiores em Lemnoideae do que em Wolffioideae (Figuras 15 e 17, Tabela 3). Já os demais monossacarídeos de parede (glicose, arabinose, ramnose, fucose, manose, xilose e galactose) foram diminuídos nas Lemnoideae e aumentaram em Wolffioideae. Logo, a partição de carbono foi desviada para os precursores UDP-Glc e UDP-GlcA, levando a maiores concentrações de celulose, xilose, arabinose, apiose e ácidos galacturônicos (Figura 6). Ao mesmo tempo, o dreno de carbono destinado a síntese de polímeros contendo manose, fucose e ramnose foram reduzidos. Nas Wolffioideae o desvio de dreno para síntese de apiose foi direcionado para UDP-Xyl para a síntese de xilose e arabinose, como também foi possível verificar o aumento do teor de glicose (Figura 6, Tabela 3).

Os teores de ácidos urônicos foram drasticamente reduzidos nas espécies avaliadas, com exceção de *Landoltia punctata* (Tabela 3). Ao mesmo tempo, o conteúdo de manose nesta espécie foi 10 vezes maior em baixa luz do que em alta luz. Estes dados podem ser examinados em conjunto com a observação de que *L. punctata*, apesar de pertencer ao grupo das Lemnoideae, apresentou um teor baixo de amido relativamente às outras espécies em baixa luz. Portanto, as observações sugerem que *L. punctata* provavelmente apresentou, na baixa luz utilizada neste trabalho, uma taxa fotossintética muito baixa. Apesar desta taxa fotossintética ainda ter sido capaz de manter um certo fluxo de carbono no sistema de forma a dar suporte a algum crescimento, o carbono assimilado parece não ter sido suficiente para que *L. punctata* pudesse construir dois dos principais drenos de carboidratos: amido e pectinas. Com o baixo fluxo operando nesta condição de baixa intensidade luminosa, parece ter passado a predominar a via de produção de manano, que usa GDP-man, em detrimento das vias que usam ADP-Glc (amido) e UDP-Glc (celulose, xilanos e poliuronídeos) (Figura 6).

As descobertas descritas acima sugerem que o fluxo de carbono nas lentilhas d'água em resposta a intensidade luminosa e o crescimento determina elementos importantes da composição de polímeros na parede celular. De tal forma que esses resultados vão além das proposições recentes (e independente das nossas) sobre a relação entre crescimento e composição da parede celular

(VERBANCIC *et al.* 2017). Para compreender o processo de modificação em resposta a luz, estudos mais profundos do metabolismo destas espécies em diferentes condições de luz precisam ser efetuados.

5.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: BIOENERGIA

Os dados levantados nesta dissertação instigam o conhecimento mais aprofundado da parede celular das lentilhas d'água, uma vez que a parede se correlaciona diretamente com o crescimento, acúmulo de amido e composição de parede distinta o que impacta significativamente a produção de biocombustíveis.

A produção de bioetanol emprega hidrolisados de material vegetal contendo hexoses como substrato para *Saccharomyces cerevisiae* (DE SOUZA *et al.*, 2014; AZHAR *et al.*, 2017). A linhagem selvagem desse organismo fermentador é capaz de processar glicose, manose, frutose, sacarose e maltose pela via metabólica da glicólise Emden-Meyerhof, enquanto que a galactose é fermentada pela ação combinada das vias Leloir e glicólise (VAN MARIS *et al.*, 2006). Por outro lado, outras fontes de carbono na forma de carboidratos (xilose, arabinose, ácido galacturônico, ramnose e apiose) – comumente encontradas em material lignocelulósico - precisam de engenharia metabólica para que *S. cerevisiae* possa acessar esses açúcares e convertê-los em etanol (CABALLERO e RAMOS, 2017; BETTIGA *et al.*, 2009; VAN MARIS *et al.*, 2006). Atualmente existem linhagens modificadas capazes de usar xilose e arabinose como fonte de carbono para a síntese de etanol, porém, estas ainda não são empregadas industrialmente (CABALLERO e RAMOS, 2017; BETTIGA *et al.*, 2009).

A composição básica da parede celular foi avaliada em lentilhas d'água neste e em trabalhos encontrados na literatura. Relatos indicaram conteúdo baixo de celulose (~10% de massa seca) quando comparado com plantas terrestres (~40% de massa seca). O conteúdo de lignina (2,7%) é considerado baixo enquanto que os de pectinas (20-33%) e dos açúcares fermentáveis (77% , >300g.Kg⁻¹) são altos (GE *et al.*, 2012; ORON, 1994; SODA *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2014). Segundo alguns autores, a glicose compreende de 13-50% da parede celular (CHEN *et al.*, 2002; EHWALD *et al.*, 1995; GE *et al.*, 2012; LONGLAND

et al., 1989; SU *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2014). No experimento relatado nesta dissertação, os teores de açúcares fermentáveis foram mais elevados com o aumento da intensidade de luz em 2,54 vezes. A glicose representou 10% da parede celular não celulósica (Tabela 3) e 30% de celulose (dados não mostrados que se referem à hidrólise H_2SO_4 em material de baixa luz).

Os conteúdos de xilose, arabinose e galactose têm sido relatados em baixas proporções (~10%) em diversas lentilhas d'água, o que pode ser considerado como favorável para a produção de etanol (CHEN *et al.*, 2002; EHWALD *et al.*, 1995; GE *et al.*, 2012; LONGLAND *et al.*, 1989; SU *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). Entretanto, o presente estudo obteve conteúdo de xilose na faixa de 22% ($16,5 \mu g.mg^{-1}$), assim como de arabinose ($15,4 \mu g.mg^{-1}$) e 17% galactose ($10,4 \mu g.mg^{-1}$) (Tabela 3). O açúcar hemicelulósico, manose, é encontrado nas proporções de $2,3 \mu g.mg^{-1}$ a 13% nas paredes das lentilhas d'água (CHANDA *et al.*, 1991; SU *et al.*, 2014; VAUGHAN *et al.*, 1992; ZHAO *et al.*, 2014). Nas condições empregadas neste estudo, o conteúdo de manose foi, em média, relativamente baixo ($2,1 \mu g.mg^{-1}$ – 3,2% da parede) (Tabela 3). Os açúcares não fermentáveis: apiose, fucose, ramnose e ácidos urônicos compõem uma grande parte da parede celular das lentilhas d'água, indicando um potencial uso de linhagens modificadas para o processo fermentativo.

A limitação do processo fermentativo da biomassa de lentilhas d'água é atribuída à baixa conversão de etanol e eficiência fermentativa, necessitando de pré-tratamentos custosos para aumentar o rendimento do processo (CHEN *et al.*, 2012; GE *et al.*, 2012). Em materiais vegetais em geral, a concentração de lignina, junto à proporção de pentoses/hexoses da parede celular, limita a acessibilidade aos açúcares fermentáveis, diminuindo a viabilidade econômica para produção de biocombustíveis (ZHAO *et al.*, 2012). Outras forças, além das ligações covalentes (ligações glicosídicas e éster), ligações mais fracas, mas relevantes, também interferem nos processos de pré-tratamento e sacarificação da biomassa (BUCKERIDGE *et al.*, 2018). Entre elas está a força iônica (características das interligações entre os homogalacturonanos), responsável pela interação entre os polissacarídeos via pontes de hidrogênio específicas (celulose-xiloglucano) e não específicas (entre polissacarídeos em geral)

(BUCKERIDGE *et al.*, 2010; FRY, 1986; O'NEILL e YORK, 2003; POGORELKO *et al.*, 2013).

A recalcitrância da parede celular à hidrólise deve ser contornada para que os polissacarídeos possam ser hidrolisados no pré-tratamento da biomassa. Essa recalcitrância se deve à arquitetura da parede, as ligações entre os polissacarídeos e a lignina, todos elementos fundamentais do código glicômico que é característico de cada material vegetal.

Os conteúdos de lignina nas cinco espécies de lentilhas d'água não passaram de 3% da parede celular (Figura 19), sendo um pouco maiores em *L. punctata* e *L. gibba* com o aumento da luz. O que foi encontrado para este composto fenólico corrobora o que tem sido descrito na literatura, ou seja, que a lignina é encontrada em quantidades traço, podendo atingir até 5,2% de parede (CHEN *et al.*, 2012; GE *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2012). Portanto, no caso das lentilhas d'água, a biomassa não deve ser recalcitrante devido a presença de lignina, mas principalmente devido às estruturas dos polissacarídeos de parede e suas interações. Ainda, estudos envolvendo o elucidado do perfil de parede, o que permite acesso à sua arquitetura, junto com a caracterização mais aprofundada dos polissacarídeos dessa parede, deverá abrir caminho para abordagens mais eficientes no que concerne à produção de combustíveis alternativos a partir da biomassa de lentilhas d'água.

6 CONCLUSÕES

A composição dos carboidratos das espécies de lentilhas d'água (Lemnaceae) estudadas neste trabalho, difere entre distintos grupos taxonômicos.

As espécies da família Lemnoideae (*Spirodela polyrhiza*, *Landoltia punctata* e *Lemna gibba*) predominam a via UDP-glicose para a síntese de açúcares estruturais e não estruturais enquanto que as espécies da família Wolffioideae (*Wolffiella caudata* e *Wolffia borealis*) tendem a acumular maiores teores de amido (via ADP-glicose). Ainda, espécies da subfamília Lemnoideae apresentam maior proporção de apiose (uma pentose) nas paredes celulares, enquanto Wolffioideae possuem mais xilose e arabinose e menos apiose. Corroborando, assim com a literatura a confirmar que Lemnoideae apresenta maiores teores do polissacarídeo apiogalacturonano e Wolffioideae maiores teores de xilogalacturonano.

O estresse de luz (baixa luz – $20 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fizeram com que as *Wolffioideae* reduzissem o conteúdo de carboidratos (tanto estruturais como não estruturais) enquanto que as *Lemnoideae* aumentaram o conteúdo de carboidratos estruturais. Em uma das espécies de *Lemnoideae* (*Landoltia punctata*) o tratamento de baixa luz levou a um desvio do metabolismo de açúcares na direção da síntese de mananos e suprimiu a produção de apiogalacturonanos demonstrando outra rota de fluxo de carbono.

Além disso, o presente trabalho mostra indícios de que o crescimento das lentilhas d'água estão correlacionados ao conteúdo de apiose positivamente e amido negativamente, sugerindo que existam distintos níveis de controle metabólico dependentes do fluxo de carbono, com capacidade de operar alterações importantes nas paredes celulares.

Conformamos a literatura em que *Lemnoideae* e *Wolffioideae* parecem ter evoluído de formas distintas, com a primeira sendo capaz de armazenar mais apiogalacturonano e com isto crescer mais, uma vez que este polímero ajuda no manejo da absorção de boro. No caso de *Wolffioideae*, há um acúmulo de xilogalacturonano em contraposição ao apiogalacturonano. No entanto, não foi possível propor uma hipótese que explique a relação estrutura-função do xilogalacturonano em *Wolffioideae*. Espécies desta última subfamília são mais

reduzidas morfológicamente, não apresentam raiz e cresceram mais lentamente, indicando que este polímero se correlaciona com o crescimento.

A biomassa das lentilhas d'água apresenta mais de 70% de açúcares não fermentáveis (decorrente dos teores de ácidos urônicos), o que levaria a um baixo rendimento na produção de etanol de segunda geração. Por outro lado, o acúmulo de amido por parte das *Wolffioideae* com menores teores de apiose faz com que estas espécies tendam a ser promissoras para a produção de etanol de primeira e de segunda geração, contanto que seja possível utilizar microrganismos modificados.

A principal novidade deste trabalho está nas inferências sobre as relações entre o crescimento e os acúmulos diversificados de drenos (principalmente amido e pectinas). Os resultados avançam tanto a ciência básica no que concerne à compreensão do metabolismo de carboidratos em plantas (em particular as lentilhas d'água), como a biotecnologia no sentido de que apresenta resultados que podem auxiliar no uso de biomassa de lentilha d'água para a bioenergia.

7 REFERÊNCIAS

- AHMED, A. E. R.; LABAVITCH, J. M. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.* v.1, n.4, p. 361-365, 1977.
- AHZAR, S.H.M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S.A; MARBAWI, H.; GANSAU, J.A.; FAIK, A.A.M.; RODRIGUES, K.F. Yeast is sustainable bioethanol production. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.10, p. 52-61 2017.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; ROBERTS, K.; SEDEROFF, R.; STAEHELIN, A. Plant cell walls: from chemistry to biology. Garland, New York. 2011.
- ALGIX, Llc. SHARMA, S. HUNT, R. W.; ZELLER, M. A. Macrophyte-based bioplastic. US Pat. n. 20130220173 A1, 2013.
- ALONSO, A. P. *et al.* Quantifying the Labeling and the Levels of Plant Cell Wall Precursors Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 915–924, 2010.
- AMARAL L.I.V.; GASPAR M.; COSTA P.M.F.; AIDAR M.P.M.; BUCKERIDGE M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34 (4): 425-431, 2007.
- APPENROTH, K.J.; BORISJUK, N.; LAM, E. Telling duckweed apart: genotyping technologies for the Lemnaceae. **Chin. J. Apl. Environment Biol.**, v. 19, n.1, p. 1-10, 2013.
- APPENROTH, K.J.; TELLER, S.; HORN, M. Photophysiology of turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*. **Biologia plantarum**, v. 38 (I), P. 95-106, 1996.
- APPENROTH, K. J.; PALHARINI, L.; ZIEGLER, P. Low molecular weight carbohydrates modulate dormancy and are required for post-germination growth in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Plant Biology*, 2013.
- AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, n. 123456789, 2017.
- BAR-PELED, M.; O'NEILL, M.A. Plant nucleotide sugar formation, interconversion and salvage by sugar recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v.62, p.127-155, 2012.
- BETTIGA, M.; BENGSTSSON, O.; HAHN-H/6AGERDAL, GORWA-GRAUSLUND. Arabinose and xylose fermentation be recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expression a fungal pentose utilization pathway. *Microb. Cell. Fact.*, 8:40, p.1-12, 2009.
- BLAZEY, E. B. .; MCCLURE, J. W. . The Distribution and Taxonomic Significance of Lignin in the Lemnaceae. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 10, p. 1240–1245, 1968.

BLEVINS, D.G.; LUKASZEWSKI, K.M. Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.49, p.481-500, 1998.

BÖCÜK, H., YAKAR, A. AND TÜRKER, O.C. Assessment of *Lemna Gibba* L. (Duckweed) as a Potential Ecological Indicator for Contaminated Aquatic Ecosystem by Boron Mine Effluent. **Ecological Indicators** **29**. Elsevier Ltd, p.538–48, 2013.

BOEX-FONTVIEILLE E, DAVANTURE M, JOSSIER M, ZIVY M, HODGES M, TCHERKEZ G. Photosynthetic activity influences cellulose biosynthesis and phosphorylation of proteins involved therein in *Arabidopsis* leaves. *J Exp. Bot.*, v.65, p. 4997-5010, 2014.

BORISJUK, N.; CHU, P.; GUTIERREZ, R.; ZHANG, H.; ACOSTA, K.; FRIESEN, N.; SREE, K.S.; GARCIA, C.; APPENROTH, J.; LAM, E. Assessment, validation and deployment strategy of a two barcode protocol for facile genotyping of duckweed species. **Plant Biology**, Epub, p.1-8, 2014.

BUCKERIDGE, M.S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v,15, p.1017–1023, 2010.

BUCKERIDGE, M.S. The evolution of the Glycomic Codes of Extracellular Matrices. **Biosystems**, v.164, p.112-120, 2018a.

BUCKERIDGE, M.S.; DE SOUZA, A.P. Breaking the “glycomic code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *Bioenerg. Res.*, v.7, p.1065-1073, 2014.

BUCKERIDGE, M.S., DE SOUZA, A.P., TAVARES, E.Q.P., CAMBLER, A.B. Sugarcane cell wall structure and degradation: from monosaccharide analyses to the Glycomic Code. In *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane* (M.S. Buckeridge & Amanda P. De Souza Eds.) Springer, New York, 7-19, 2017.

BUCKERIDGE, M.S., GRANDIS, A., TAVARES, E.Q.P. Disassembling the Glycomic Code of Sugarcane Cell Walls to Improve Second-Generation Bioethanol Production. Chapter 2 In *Bioethanol Production from Food Crops* (R. C. Ray & S. Ramachandran Eds). ISBN-13: 978-0128137666, 2018b.

BUCKERIDGE, M.S.; RAYON, C.; URBANOWICZ, B.; TINÉ, M.A.S.; CARPITA, N.C. Mixed linkage (1-3),(1-4)-beta-D-glucans of grasses. **Cereal Chemistry**, v.81, n.1, p.115-127, 2004.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; TINÉ, M. A. S.; SOUZA, A. P. The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. In: *Compendium of bioenergy: Sugarcane*. CRC Press, 2015, p. 31-50.

BURTON, R.A.; GIDLEY, M.J.; FINCHER, G.B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, vol.6, p. 724-732, 2010.

CABALLERO, A.; RAMOS, J.L. Enhancing ethanol yields through d-xylose and L-arabinose co-fermentation after construction of a novel high efficient L-

araninose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Microbiology**, v. 163, p.442-452, 2017.

CAFFALL, K.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.344, p.1879-1900, 2009.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J.J.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron in plants: Deficiency and toxicity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1247–1255, 2008.

CAMACHO-CRISTOBÁL, J.J.; MARTÍN-REJANO, E.M.; HERRERA-RODRÍGUEZ, M.B.; NAVARRO-GOCHICOA, M.T.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency inhibits root cell elongation via an ethylene/auxin/ROS-dependent pathway in *Arabidopsis* seedlings. *J. exp. Bot.*, v.66, n.13, p.3831-3840, 2015.

CARPITA, N. C. Cell wall development in maize coleoptiles. **Plant Physiology**, v. 76, p. 205–212, 1984.

CARPITA, N.C. Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.47, p.445-476, 1996.

CARPITA, N. C. Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1-4)-D-Glycans. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 171–184, 2011.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant J.**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

CARPITA, N.C.; MCCANN, M. The cell wall. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, M.D., USA: American Society of Plant Physiologists, p. 52–108, 2000.

CHANDA, S.; BHADURI, S.K.; SARDAR, D. Chemical characterization of pressed fibrous residues of four aquatic weeds. *Aquatic Botany*, v.42, p.81-85, 1991.

CHAPIN, F.S.; SCHULTZE, E.D.; MOONEY, H.A. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 21, p.423-447, 1990.

CHEN, Q.; JIN, Y.; ZHANG, G.; FANG, Y.; XIAO, Y.; ZHAO, H. Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. **Energies**, v. 5, n. 8, p. 3019–3032, 2012.

CHEN, X.Y.; KIM, J.Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant Signaling & Behavior**. Vol.4, n.6, p.489-492, 2009.

CHENG, J.; BERGMANN, B.A.; CLASSEN, J.J.; STOMP, A.M.; HOWARD, J.W. Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresource Technol.*, v.81, p.81-85, 2002.

COSGROVE, D. J. Diffuse growth of plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 176,

p. 16-27, 2018.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v.6, p. 850-861, 2005.

COSGROVE, D. J. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. **New Phytol.**, v.124, p.1-23, 1993.

CUI, W.; XU, J.J.; CHENG, A.M.; STOMP, A. M. Starch accumulation in duckweed for bioethanol production. *Biological Engineering*, v.3, n.4, p.187-197, 2011.

CULLEY, D. D. Jr.; EPPS, E. A. Use of duckweed for wastewater treatment and animal feed. *J. Water Environm. Federation*, v. 45, n.2, p.337-347, 1973.

DAVIS, S.M.; DRAKE, K.D.; MAIER, K.J. Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodela polyrhiza*. *Chemosphere*, v.48, p.615-620, 2002.

DEMARTY, M.; MORVAN, C.; THELLIER, M. Exchange Properties of Isolated Cell Walls of *Lemna minor* L. 1. **Plant physiology**, v. 62, p. 477–481, 1978.

DE SOUZA, A. P.; GRANDIS, A.; LEITE, D. C. C.; BUCKERIDGE, M.S. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **Bioenergy Research**, v. 7, p.24-35, 2014.

DE SOUZA, A.P.; LEITE, D.C.C. PATTATHIL, S.; HAHN, M.G. BUCKERIDGE, M.S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v.6, p.564-579, 2013.

DING, S. Y.; ZHAO, S.; ZENG, Y. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 863–871, 2014.

DUFF, R.B. The occurrence of apiose in *Lemna* (duckweed) and other angiosperms. *Biochem. J.*, v.94, p.768-772, 1965.

EHWALD, R.; KLEIN, P.; JUNGNIKKEL, F.; DONGOWSKI, G. Permeation chromatography on extracted *Wolffia*. *Phytochem. Analysis*, v.6, p. 233-238, 1995.

FARRAR, J.F.; WILLIAMS, M.L. The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon-partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, cell and environment*, v.14, p.819-830, 1991.

FAO. Duckweed: a tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. Roma: FAO, p.108, 1999.

FEISCHER, A.; TITEL, C.; EHWALD, R. The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiol.*, v.117, p. 1401-1410, 1998.

FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.37, p.165-186, 1986.

FRY, S.C. Primary cell wall metabolism: tracking the carriers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, v.161, p.641-675, 2004.

FRY, S. C. The structure and function of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 210, p. 1–11, 1989.

FUKUSHIMA, R.S.; KERLEY, M.S.; RAMOS, M.H.; PORTER, J.H.; KALLENBACH, R.L. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. **Animal Feed Science and Technol.**, v.201, p.25-37, 2015.

GALL, H. *et al.* Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112–166, 2015.

GE, X.; ZHANG, N.; PHILLIPS, G.; XU, J. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 485-488, 2012.

GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB Journal**, v. 8, n. 12, p. 904–915, 1994.

GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant physiology**, v. 153, n. 2, p. 444–55, 2010.

GLANDON, R.P.; MCNABB, C.D. The uptake of boron by *Lemna minor*. **Aquatic Botany**, v.4, p.53-64, 1978.

GRANDIS, A.; DE SOUZA, A. P.; TAVARES, E. Q. P.; BUCKERIDGE, M. S. Plants and BioEnergy. **Plants and BioEnergy, Advances in Plant Biology**, p. 211–230, 2014.

GOLDBACH, H.E.; WIMMER, M.A. Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure? *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, v.170, p.39-48, 2007.

GOMEZ, L.D.; STEELE-KING, C.G.; McQUEEN-MASON, S.J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v.178, p.473-485, 2008.

GORDON, A.J.; RYLE, G.J.A.; WEBB, G. J. *Exp. Botany*, v. 31, n.122, p.845-850, 1980.

GÜR, N., TÜRKER, O.C. AND BÖCÜK, H. Toxicity Assessment of Boron (B) by *Lemna Minor* L. and *Lemna Gibba* L. and Their Possible Use as Model Plants for Ecological Risk Assessment of Aquatic Ecosystems with Boron Pollution. **Chemosphere**, v.157, p.1–9, 2016.

GUYETT, P.; GLUSHKA, J.; GU, X.; BAR-PELED, M. Real-Time NMR Monitoring of Intermediates and Labile Products of the Bifunctional Enzyme UDP-apiose/UDP-Xylose Synthase. **Carbohydrate Research**, v.75, n.5, p. 1781–91, 2009.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; VIBE SCHELLER, H. Biosynthesis of Pectin. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 384–395, 2010.

HART, D. A; KINDEL, P. K. Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of *Lemna minor*. **The Biochemical journal**, v. 116, n. 4, p. 569–579, 1970.

HIMMEL, M.E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p.804-807, 2007.

HOCH, G.; RICHTER, A.; KÖRNER, Ch. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant, Cell, and Environ.** 26, p.1067-1081, 2003.

HU, H.; BROWN, P.H.; LABAVITCH, J.M. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.*, v. 47, n.295, p.227-232, 1996.

ISCDRA. Newsletter of the community of duckweed research and applications. Duckweed forum. Vol.4 (3), n.14, p.272-303. Jul., 2016.

IVAKOV, A.; FLIS, A.; FEDERICO, A.; FÜNFGELD, M.; SCHERER, U.; STITT, M.; KRAGLER, F.; VISSENBERG, K.; PERSSON, S.; SUSLOV, D. Cellulose synthesis and cell expansion are regulated by different mechanisms in growing *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant cell Adv. Publ.*, p.1-29, 2017. doi:10.1105/tpc.16.00782.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T.; HAYASHI, N. Formation of Rhamnogalacturonan II-Borate Dimer in Pectin Determines Cell Wall Thickness of Pumpkin Tissue. **Plant Physiol.**, v. 126, n. 4, p. 1698–1705, 2001.

JARVIS, M.C.; FORYTH, W.; DUNCAN, H. J. A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiol.*, v. 88, p.308-314, 1988.

JARVIS, M. C. Plant cell walls: supramolecular assemblies. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 257-262, 2011.

JIN, Z., KATSUMATA, K.S., LAM, T.B.T., LIYAMA, K. Covalent linkages between cellulose and lignin in cell walls of coniferous and nonconiferous woods. **Biopolymers**, v. 83, p.103-110, 2006.

KALLURI, U. C.; KELLER, M. Bioenergy research: a new paradigm in multidisciplinary research. **J. R. Soc. Interface**, 7, p. 1391-1401, 2010.

KEEGSTRA, K. Plant cell walls. **Plant physiology**, v. 154, n. 2, p. 483–486, 2010.

KIM, I. Development of the Root System in *Schleiden* (*Lemnaceae*) (*L.*). v. 50, p. 540–547, 2007.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X.J.; LINDER, C.R.; BROWN, R.M. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **Plant Cell**, v.11, p.2075–85, 1999.

KRZESLOWSKA, M.; RABEDA, I.; BASINSKA, A.; LEWANDOWSKI, M.; MELLEROWICZ, E.J.; NAPIERALSKA, A.; SAMARDAKIEWICZ, S.; WOZNY, A. Pectinous cell wall thickenings formation-A common defense strategy of plants to cope with Pb. **Environ. Pollut.**, v. 214, p. 354–361, 2016.

LALONDE, S.; BOLES, E.; HELLMANN, H.; BARKER, L.; PATRICK, J.W.; FROMMER, W.B.; WARD, J.M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. **Plant Cell**, v.11, p.707-726, 1999.

LAM, E.; APPERNROTH, K.J.; MICHAEL, T.; MORI, K.; FAKHOORIAN, T. Duckweed in bloom: the 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications heralds the return of a plant model for plant biology. **Plant Mol. Biol.**, v.84, p.737-747, 2014.

LANDOLT, E. Lemnaceae duckweed Family. **Journal of the Arizona-Nevada academy of Science**. v. 26, n. 1, p.10-14, 1992.

LANDOLT, E.; KANDELER, R. The family of Lemnaceae- A monographic study. Phytochemistry, physiology, application, bibliography. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH, Stiftung, Rubel, Zurich, Switzerland.1987.

LECLERE, L.; VAN CUTSEM, P.; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH or heat modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, v. 4, issue 128, p.1-8, 2013.

LEEGOOD, R.C.; SHARKEY, T.; VON CAEMMERER, S. Introduction in: Leegood, R.C.; Sharkey, T.; Von Caemmerer, S. Photosynthesis: Physiology and metabolism. Kluwer Academy Publishers, p. 1-8, 2000.

LEITE, D.C.C. Modificações da parede celular durante a formação de aerênquima em raízes de cana-de-açúcar. Tese (Mestrado em Ciências)- São Paulo: USP, 2013. 106 f.

LES, D. H.; CRAWFORD, S. J.; LANDOLT, E.; GABEL, J. D.; KIMBALL, R. T. Phylogeny and Systematics of *Lemnaceae*, the duckweed family. **Systematic Botany**, v. 27, n.2, p.230, 2002.

LI, S.; BASHLINE, L.; LEI, L.; GU, Y. Cellulose synthesis and its regulation. The Arabidopsis book, p.1-21, 2014. doi: 10.1199/tab.0169.

LI, Y.; FANTAO, Z.; DAROCH, M.; JIE, T. Positive effects of duckweed polycultures on starch and protein accumulation. *Biosol. Rep*, v. 36, p.1-8; 2016.

LIEPMAN, A. H.; CAVALIER, D. M. The cellulose synthase-like a and cellulose synthase-like C families: recent advances and future perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 1–7, 2012.

LIONETTI, V. *et al.* Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 616–621, 2010.

LONGLAND, J. M.; FRY, S. C.; TREWAVAS, A. J. Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. **Plant physiology**, v. 90, p. 972–976, 1989.

MARCUS, S.E. *et al.* Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. **The Plant Journal**, v. 64, n.2, p.191-203, 2010.

MATOH, T. KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *J. Plant Res.*, v.111, 179-190, 1998.

MATSUNAGA, T.; ISHII, T.; MATSUMOTO, S.; HIGUCHI, M.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P.; O'NEILL, M.A. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes and

briophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol.*, v. 134, p. 339-351, 2004.

McQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D.J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by protein that induce wall extension. **Proc. Natl. Aca. Sci. USA**, v. 91, p.6574-6578, 1994.

MEENTS, M.J.; WATANABE, Y.; SAMUELS, A.L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. **Ann. Bot.**, v. 121, p.1107-1125, 2018.

MIWA, K.; FUJIWARA, T. Boron transport in plants: Co-ordinated regulation of transporters. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1103–1108, 2010.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MØLHØJ, M.; VERMA, R.; REITER, W. D. The biosynthesis of the branched-chain sugar d-apiose in plants: Functional cloning and characterization of a UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase from Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 35, p. 693–703, 2003.

NEDUKHA, O. M. Callose: localization, function, and synthesis in plant cells. *Cytology and Genetics*, vol. 49, n.1, p.49-57, 2015.

NISHIMURA, H., KAMIYA, A., NAGATA, T., KATAHIRA, M., WATANABE, T. Direct evidence for alpha ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. **Scientific Reports**, v.8, 6538, 2018.

OLÁH, V.; HEPP, A.; MÉSZÁROS, I. Assessment of Giant Duckweed (*Spirodela polyrhiza* L. Schleiden) Turions as Model Objects in Ecotoxicological Applications. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 5, p. 596–601, 2016.

O'NEILL, M. A.; ISHII, T.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 109–139, 2004.

O'NEILL, M.A.; YORK, W.S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The Plant Cell Wall*. Annual Plant Reviews. Blackwell Publishing-CRCR PRESS, vol. 8, 2003. Cp.1, p.1-55.

ORON, G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. *Agricultural water management*, v. 25, p. 27-40, 1994.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; SHASHKOV, A.S.; POPOV, S.V.; OVODOV, Y. S. Structural studies and physiological activity of lemnan, a pectin from *Lemna minor* L. **Bioorganicheskaya Khimiya**, v. 26, n. 10, p. 743–751, 2000.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Cur. Opinion in Plant Biol.**, v.13, p.305-312, 2010.

PAULY, M.; QIN, Q.; GREENE, H.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; YORK, W.S. Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. **Planta**, v.212, p.842-850, 2000.

PERRY, T.O. Dormancy, turion formation and germination by different clones of *Spirodela polyrrhiza*. **Plant Physiol.**, v. 43, p. 1866-1869, 1968.

PIČMANOVÁ, M.; MØLLER, B. L. Apiose: One of nature's witty games. **Glycobiology**, v. 26, n. 5, p. 430–442, 2016.

PLOTT, V.J. *Lemnaceae*. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.L.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S.; BITTRICH, V.; KAMEYAMA, C. (eds). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica, São Paulo, v.2, p.135-140, 2002.

POGORELKO, G.; LIONETTI, V.; BELLINCAMPI, D.; ZABOTINA, O. Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, p. e25435, 2013.

POPOV, S. V.; GÜNTHER, E. A.; MARKOV, P. A.; SMIRNOV, V. V.; KHRAMOVA, D.S.; OVODOV, Y. S. Adjuvant effect of lemnan, pectic polysaccharide of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration. **ImmunoPharmacology and Immunotoxicology**, v. 28, n. 1, p. 141–152, 2006.

POPPER, Z. A.; MICHEL, G.; HERVÉ, C.; DOMOZYCH, D.S.; WILLATS, W.G.T.; TUOHY, M.G.; KLOAREG, B.; STENGEL, D. B. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 62, p. 567–590, 2011.

POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, n.3, p.286-292, 2008.

POWER, P.P.; WOODS, W.G. The chemistry of boron and speciation in plants. *Plant Soil*, 193, p.1-13, 1997.

QUENTIN, A.G. *et al.* Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology*, v. 35, p.1146-1165. 2015.

RENNIE, E.A.; SCHELLER, H.V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnol.**, v.26, p.100-107, 2014.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v.57, p. 929–967, 2001.

ROSA, M.; PRADO, C.; PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J.A.; HILAL, M.; PRADO, F.E. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, vol.4, n.5, p. 388-393, 2009.

ROUDIER, F. *et al.* COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. **Plant Cell**, v.17, p.1749–63, 2005.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; DE MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p.279-291, 2003.
- SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: Towards a molecular understanding of their design principles. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3615–3635, 2009.
- SAXENA, I. M.; BROWN, R. M. Cellulose biosynthesis: Current views and evolving concepts. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 9–21, 2005.
- SCHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 61, p.263-269, 2010.
- SCHULZE, W.; STITT, M.; SCHULZE, E.D.; NEUHAUS, H.E.; FICHTNER, K. A. Quantification of the Significance of Assimilatory Starch for Growth of *Arabidopsis Thaliana* L. Heynh. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 890–95, 1991.
- SHAHZAD, M.A.; KHAN, A.; KHALID, M.; GUL, A. Plant glycomics. In: *Plant Omics: Trends and Applications*. Springer Int. Pub. Switzerland. 2016, p. 445-476.
- SILVA, G.B.; IONASHIRO, M.; CARRARA, T.B.; CRIVELLARI, A.C.; TINÉ, M.A.; PRADO, J.; CARPITA, N.C.; BUCKERIDGE, M.S. Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p.2352-2360, 2011.
- SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. p.12-28. 2010.
- SMART, C.C.; TREWAVAS, A. J. Absciscic-acid-induced turion formation in *Spirodela polyrhiza* L. II. Ultrastructure of the turion a stereological analysis. **Plant, Cell and Environ.**, v. 6, p. 515-522, 1983.
- SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, 2007.
- SMITH, B.G.; HARRIS, P.J. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p. 33–53, 1999.
- SODA, S.; OHCHI, T.; PIRADEE, J.; TAKAI, Y.; IKE, M. Duckweed biomass as a renewable biorefinary feedstock: ethanol and succinate production from *Wolffia globosa*. *Biomass and Bioenergy*, v.81, p.364-368, 2015.
- SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol*, vol.99, p.1267-1270, 1992.
- SOMMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v.22, p.52-68, 2006.
- SORENSEN, I.; PETTOLINO, F.A.; WILSON, S.M.; DOBLIN, M.S.; JOHANSEN, B.; BACIC, A.; WILLIATS, W.G.T. Mixed-linkage (1→3), (1→4)-β-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of *Equisetum arvense* cell walls. **The Plant J.**, v.54, p.510-21, 2008.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seed galactomannans: an overview. **Chem. Biodivers.**, v. 2, p. 295–317, 2005.

STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 282–292, 2012.

STOMP, A.M. The duckweed: a value plant for biomanufacturing. **Biotech. Ann. Review**, v. 11, p.69-99, 2005.

SU, H.; ZHAO, Y.; JIANG, J.; LU, Q.; LI, Q.; LUO, Y.; ZHAO, H.; WANG, M. Use of duckweed (*Landoltia punctata*) as a fermentation substrate for the production of higher alcohols as biofuels. **Energy & Fuels**, p.1-11, 2014.

SULPICE, R. *et al.* Starch as a Major Integrator in the Regulation of Plant Growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10348–53, 2009.

TAO, X.; FANG, Y.; XIAO, Y.; JIN, Y.; MA, X.; ZHAO, Y.; HE, K.; ZHAO, H.; WANG, H. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Biotech. For Biofuels*, 6:72, p.1-15, 2013.

TAVARES, E.Q.P.; DE SOUZA, A. P.; BUCKERIDGE, M.S. How endogenous plant cell wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass. *J. Exp. Bot.*, v. 66, n.14, p.4133-4143, 2015.

TENHAKEN, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. January, p. 1–9, 2015.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796–815, 2000.

TÜRKER, O.C., YAKAR, A. AND GÜR, N. Bioaccumulation and Toxicity Assessment of Irrigation Water Contaminated with Boron (B) Using Duckweed (*Lemna gibba* L.) in a Batch Reactor System. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324. Elsevier B.V. p.151–59, 2016.

URBANOWICZ, B.R.; RAYON, C.; CARPITA, N.C. Topology of the maize mixed linkage (1 →3),(1 → 4)-beta-D-glucan synthase at the Golgi membrane. **Plant Physiol.**, v. 134, p. 758–68, 2004.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and structure. *Plant Phys.*, v. 153, p. 895-905, 2010.

VAN MARIS, A.J.A.; ABBOTT, D.A.; BELLISIMI, E.; BRINK, J.V.D.; KUYPER, M.; LUTTIK, M.A.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; DIJKEN, J.P.V.; PRONL, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antoine van Leeuwenhoek*, v. 90, p. 391-418, 2006.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, no 12, p. 141-153, 2007.

VAUGHAN, D.; RUSSELL, J.D.; CHESHIRE, M.V.; FRASER, A.R. The use of chemical and infra-red spectral analysis to verify the identification of two species of duckweed, *Lemna minor* L. and *Lemna gibba* L. grown under defined conditions. *J. of Experimental Botany*, v.43, n.251, p.865-870, 1992.

VENKETACHALAM, S. *et al.* Analyses of Cell Wall Glycans Using Glycome Profiling in Two Commercially Important Lignocellulosic Fiber Raw Materials. **Journal of Textile Science & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 1–4, 2013.

VERBANCIC, J., LUNN, J.E., STITT, M., PERSSON, S. Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. **Molecular Plant**, v.11, p.75-94, 2017.

VERMA, R.; SUTHAR, S. Bioenergy potential of duckweed (*Lemna gibba* L.) biomass. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 38, n. 15, p. 2231–2237, 2016.

WANG, W.; KERSTETTER, R.A.; MICHAEL, T. P. Evolution of Genome Size in Duckweeds (Lemnaceae). **Journal of Botany**,v. 2011, p.1-9, 2011.

WANG, W.; WU, Y.; MESSING, J. RNA-Seq transcriptome analysis of *Spirodela* dormancy without reproduction. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 60, jan. 2014.

WANG, W.; WU, Y.; MESSING, J. Genome-wide analysis of pentatricopeptide-repeat proteins of an aquatic plant. **Planta**, v. 244, n. 4, p. 893–899, 2016.

WANGERMANN, E.; ASHBY, E. A discussion on morphogenesis: morphogenesis in *Lemna minor*. Proceedings of the Linnean Society of London, v. 162, n.1, p.10- 13, 1950.

WILLATS, W.G.T. McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 9-27, 2001.

WHISTLER, R.L.; CHEN, C.C. Hemicelluloses. In *Wood Structure and Composition*, Lewin, M. and Goldstein, I.S., eds. New York: Marcel Dekker Inc, p. 287–319, 1991.

WOLF, S.; HÉRMATY, K.; HÖFTE, H. Growth control and cell wall signalling in plants. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v.63, p.381-407, 2012.

XIAO, Y.; FANG, Y.; JIN, Y.; ZHANG, G.; ZHAO, H. Culturing duckweed in the field for starch accumulation. *Industrial Crops and Products*, v. 48, p.183-190, 2013.

XU, J.; CUI, W.; CHENG, J.J.; STOMP, A.M. Production of high starch duckweed and its conversion to bioethanol. **Biosyst. Eng.** 110, p. 67-72, 2011.

XYLÄNDER, M.; ÅRGSTEN, H.; APPENROTH, K. J. Influence of nickel on life cycle of the duckweed *Spirodela polyrrhiza* (L.) *Scheleiden*. *J. Plant Physiol.*, v. 142, p. 208-213, 1993.

YADAH, D.; BARBORA, L.; BORA, D.; MITRA, S.; RANGAN, L.; MAHANTA, PINAKESWAR. Na assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**. p. 1-7, 2016.

YIN, Y.; YU, C.; YU, L.; ZHAO, J.; SUN, C.; MA, Y.; ZHOU, G. The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. *Bioresource Technol.*, v. 187, p.84-90, 2015.

YORK, W. S. *et al.* Plant Molecular Biology. **Methods in Enzymology**, v. 118, p. 3–40, 1985.

YORK, W.S. O'NEILL, M.A. Biochemical control of xylan biosynthesis – which end is up? **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.258-265, 2008.

YU, C.; ZHAO, X.; QI, G.; BAI, Z.; WANG, Y.; WANG, S.; MA, Y.; LIU, Q.; HU, R.; ZHOU, G. Integrated analysis of transcriptome and metabolites reveals an essential role of metabolic flux in starch accumulation under nitrogen starvation in duckweed. *Biotechnol. for Biofuels*, 10:146, 2017. Doi 10.1186/s13068-017-0851-8.

ZHAO, X.; ELLISTON, A.; COLLINS, S.R.A; MOATES, G.K.; COLEMAN, M.J.; WALDROW, K.W. Enzymatic saccharification of duckweed (*Lemna minor*) biomass without thermophysical pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 354–361, 2012.

ZHAO, X.; MOATES, G.K.; WELLNER, N.; COLLINS, S.R.A.; COLEMAN, M.J.; WALDRON, K.W. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 410–8, 2014.

ZEEMAN, S.C. Carbohydrate metabolism. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Eds). American Society of Plant Physiologists, p. 567-610, 2015.

ZIEGLER, P.; ADELMANN, K.; ZIMMER, S.; SCHMIDT, C.; APPENROTH, K.J. Relative in vitro growth rates of duckweeds (*Lemnaceae*) – the most rapidly growing higher plants. **Plant Biology**, v. 17, p. 33–41, 2015.

8. APÊNDICE

8.1. Apêndice 1 – Análise estatística da composição geral da biomassa de lentilhas d'água

Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão (n=4). As análises estatísticas entre as espécies foram realizadas com ANOVA one-way para cada intensidade de luz e açúcar separadamente (p-valor na coluna). A análise de variância seguiu a comparação de médias pelo teste de Tukey (linha) com intervalo de confiança $\geq 95\%$. Enquanto que a análise entre os tratamentos foi realizada através do teste-T para cada uma das espécies separadamente (p-valor em linhas). Os valores significativos estão representados em negrito.

		<i>S. polyrhiza</i>	<i>L. punctata</i>	<i>L. gibba</i>	<i>W. caudata</i>	<i>W. borealis</i>	<i>p-valor</i>
% Parede celular	Baixa luz	50,16 $\pm$ 1,64 ^b	58,84 $\pm$ 0,80 ^a	51,33 $\pm$ 1,76 ^b	48,42 $\pm$ 17,4 ^b	47,74 $\pm$ 0,63 ^b	0,000
	Alta luz	36,23 $\pm$ 0,84	40,67 $\pm$ 1,72	41,67 $\pm$ 1,41	30,63 $\pm$ 3,38	30,63 $\pm$ 3,38	0,164
	<i>p-valor</i>	0,019	0,003	0,009	0,831	0,013	
% Açúcares solúveis	Baixa luz	17,24 $\pm$ 4,26	7,02 $\pm$ 1,08	12,05 $\pm$ 4,38	8,85 $\pm$ 0,98	11,68 $\pm$ 2,26	0,209
	Alta luz	15,04 $\pm$ 1,12	16,85 $\pm$ 1,35	25,21 $\pm$ 2,36	22,03 $\pm$ 3,34	35,19 $\pm$ 10,82	0,103
	<i>p-valor</i>	0,396	0,006	0,004	0,246	0,477	
% Amido	Baixa luz	5,52 $\pm$ 1,38 ^{ab}	1,19 $\pm$ 0,07 ^b	7,40 $\pm$ 2,36 ^{ab}	6,65 $\pm$ 1,88 ^{ab}	9,47 $\pm$ 2,19 ^a	0,054
	Alta luz	3,29 $\pm$ 0,19 ^b	1,85 $\pm$ 0,32 ^b	0,68 $\pm$ 0,02 ^b	10,69 $\pm$ 2,06 ^a	17,53 $\pm$ 2,76 ^a	0,000
	<i>p-valor</i>	0,163	0,193	0,409	0,198	0,105	
% Outros	Baixa luz	27,07 $\pm$ 5,59	32,93 $\pm$ 1,89	29,21 $\pm$ 3,18	35,97 $\pm$ 2,17	31,10 $\pm$ 1,94	0,373
	Alta luz	45,43 $\pm$ 1,59 ^b	40,61 $\pm$ 1,41 ^{ab}	32,43 $\pm$ 2,49 ^{abc}	24,11 $\pm$ 6,14 ^{bc}	17,02 $\pm$ 5,59 ^c	0,000
	<i>p-valor</i>	0,003	0,474	0,077	0,665	0,145	

8.2. Apêndice 2 - Manuscrito

Manuscrito submetido para publicação no periódico *Frontiers in Chemistry*, na seção Agricultural Biological Chemistry em edição especial - Duckweed: Biological Chemistry and Applications.

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE Provisionally accepted The full-text will be published soon. [Notify me](#)

Front. Chem. | doi: 10.3389/fchem.2018.00291

Correlation of Apiose Levels and Growth Rates in Duckweeds

Debora Pagliuso¹, Adriana Grandis¹, Eglee S. Igarashi¹, Eric Lam^{2*} and Marcos Buckeridge^{1*}

¹Department of Botany, Universidade de São Paulo, Brazil

²Department of Plant Biology, Rutgers University, The State University of New Jersey, United States

The carbon assimilated by photosynthesis in plants can be partitioned into starch, soluble sugars, and cell wall polymers. Higher levels of starch accumulation in leaves are usually correlated with a lower growth capacity. Duckweeds are fast-growing aquatic monocot plants that can accumulate high levels of starch. They are an unusual group because their cell wall has very low levels of lignin while accumulating apiogalacturonan, a pectic polysaccharide that could be involved with boron assimilation. In this work, five duckweed species from different genera (*Spirodela polyrhiza*, *Landoltia punctata*, *Lemna gibba*, *Wolffiella caudata*, and *Wolffia borealis*) were cultivated under two light intensities (20 and 500 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to evaluate the effects of growth rate on carbohydrate metabolism. A comparative analysis was performed by measuring their relative growth rates (RGR), and their content for starch, as well as soluble and cell wall carbohydrates. We found that the faster-growing species (the Lemnoideae) accumulate lower starch and higher soluble sugars than the slower-growing species within the Wolffioideae. Interestingly, analysis of the cell wall monosaccharides revealed that the slower-growing species displayed lower content of apiose in their walls. Our results indicate that higher accumulation of apiose observed in cell walls of the Lemnoideae species, which likely correlates with a higher proportion of apiogalacturonan, may lead to higher efficiency in the assimilation of boron. This is consistent with the increased RGR observed under conditions with higher apiose in the cell wall, such as higher light intensity. Consistent with their lower growth capacity, the Wolffioideae species we studied shows higher starch accumulation in comparison with the Lemnoideae species. We suggest that apiose levels could be good biomarkers for growth capacity of duckweeds and suggest that boron uptake could be an important factor for growth control in this aquatic plant family.

Keywords: Duckweeds, Apiose, Starch metabolism, Cell Wall, growth rate, Lemnoideae, Wolffioideae

Received: 13 Feb 2018; **Accepted:** 25 Jun 2018.

Edited by:

[Marvin Edelman](#), weizmann institute of science, Israel

Reviewed by:

[Autar K. Mattoo](#), United States Department of Agriculture, United States

[Yubin Ma](#), Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology (CAS), China

Copyright: © 2018 Pagliuso, Grandis, Igarashi, Lam and Buckeridge. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

* **Correspondence:**

Prof. Eric Lam, Rutgers University, The State University of New Jersey, Department of Plant Biology, New Brunswick, 08901, United States, ericL89@hotmail.com

Prof. Marcos Buckeridge, Universidade de São Paulo, Department of Botany, São Paulo, Sao Paulo, Brazil, msbucker

Correlation of Apiose Levels and Growth Rates in Duckweeds

Débora Pagliuso¹, Adriana Grandis¹, Eglee S. Igarashi¹, Eric Lam^{2*}, Marcos S.

Buckeridge^{1*}

¹ Laboratory of Plant Physiological Ecology, Institute of Biosciences, Department of Botany, Systems and Synthetic Biology (S2B) Center, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Plant Biology and Pathology, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, USA

* Correspondence: Eric Lam: eric.lam@rutgers.edu; Marcos S. Buckeridge: msbuck@usp.br

Abstract

The carbon assimilated by photosynthesis in plants can be partitioned into starch, soluble sugars, and cell wall polymers. Higher levels of starch accumulation in leaves are usually correlated with a lower growth capacity. Duckweeds are fast-growing aquatic monocot plants that can accumulate high levels of starch. They are an unusual group because their cell wall has very low levels of lignin while accumulating apiogalacturonan, a pectic polysaccharide that could be involved with boron assimilation. In this work, five duckweed species from different genera (*Spirodela polyrhiza*, *Landoltia punctata*, *Lemna gibba*, *Wolffiella caudata*, and *Wolffia borealis*) were cultivated under two light intensities (20 and 500 $\mu\text{moles of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) to evaluate the effects of growth rate on carbohydrate metabolism. A comparative analysis was performed by measuring their relative growth rates (RGR), and their content for starch, as well as soluble and cell wall carbohydrates. We found that the faster-growing species (the Lemnoideae) accumulate lower starch and higher soluble sugars than the slower-growing species within the Wolffioideae. Interestingly, analysis of the cell wall monosaccharides revealed that the slower-growing species displayed lower content of apiose in their walls. Our results indicate that higher accumulation of apiose observed in cell walls of the Lemnoideae species, which likely correlates with a higher proportion of apiogalacturonan, may lead to higher efficiency in the assimilation of boron. This is consistent with the increased RGR observed under conditions with higher apiose in the cell wall, such as higher light intensity. Consistent with their lower growth capacity, the Wolffioideae species we studied shows higher starch accumulation in comparison with the Lemnoideae species. We conclude that apiose levels in both soluble and cell wall-linked forms could be good biomarkers for growth capacity of duckweeds and suggest that boron uptake could be an important factor for growth control in this aquatic plant family.

Keywords: duckweed, Lemnoideae, Wolffioideae, starch, cell wall, apiose, and growth.

1 INTRODUCTION

Duckweeds (the family Lemnaceae) are the smallest monocots and live as free-floating aquatic plants (Landolt 1992; Appenroth, Borisjuk, and Lam 2013). The 37 species of Lemnaceae have been classified into five genera (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella*, and *Wolffia*) based on their morphology and physiology (Borisjuk *et al.* 2015). They are further subdivided into two subfamilies, the Lemnoideae (*Spirodela*, *Landoltia*, and *Lemna*) and Wolffioideae (*Wolffiella* and *Wolffia*) (Les *et al.* 2002), the latter being the rootless duckweeds. Fast-growing and starch accumulation capacities are some of the main features of duckweed, with some strains having been shown to double in biomass within 96 h (10 times faster than maize) (Yu *et al.* 2014).

Plant growth depends on carbon assimilation through photosynthesis. During the day, starch is synthesized and stored in the plastids, whereas sucrose is stored in vacuoles or directly used for growth. In the dark, the stored starch will serve as the main compound to support plant growth (Mengin *et al.* 2017). Thus, starch contents vary according to photoperiod (Smith and Stitt 2007; Fernandez *et al.* 2017; Zeeman, Smith, and Smith 2007; Zeeman, Kossmann, and Smith 2010). Yin *et al.* (2015) found positive correlations between day length, light intensity, and level of starch accumulation in *Lemna aequinoctialis*. Starch levels are also found to be related to the nutrient status (Xiao *et al.*, 2013). These authors found that growth of *Landoltia punctata*, *Spirodela polyrhiza*, and *L. aequinoctialis* is boosted with a concomitant decrease of starch under higher availability of P and N. Thus, lower concentrations of starch can be a sign for higher growth rates and vice-versa.

In plants, most of the carbon assimilated by photosynthesis is partitioned into cell walls (Vaughan *et al.* 1992; Verbancic *et al.* 2017). Plant cell walls form a Glycomic Code (Buckeridge 2017) that may help to determine their structure-function relationship. The cell wall is composed of polysaccharides, phenolic compounds, and proteins, the former being quantitatively more dominant. Besides providing mechanical support for plant tissues, the cell wall also acts as a defense mechanism by presenting a physical barrier to biological invaders (Sarkar, Bosneaga, and Auer 2009; Kalluri and Keller 2010). In cell walls, cellulose microfibrils are the architectural core to which hemicelluloses (xyloglucan, arabinoxylans, mannans, beta-glucans, and others) are attached.

This domain (cellulose-hemicellulose) is immersed in a matrix of pectins that include homogalacturonans and rhamnogalacturonans, branched with neutral chains of galactans, arabinans, and arabinogalactans (Carpita and Gibeaut 1993). In this regard, the pectin domain of many duckweeds is unique. Besides rhamnogalacturonans and arabinogalactans (Venketachalam *et al.* 2013), many species of the Lemnaceae have been found to have cell walls enriched with apiogalacturonan, a pectin polymer rich in apiose (Mølhøj, Verma, and Reiter 2003; Hart and Kindel 1970; Bar-Peled and O'Neill 2011; O'Neill *et al.* 2004; Miwa and Fujiwara 2010; Camacho-cristóbal, Rexach, and González-Fontes 2008). Recently, Avci *et al.* (2017) observed that pectins in Lemnoideae are mainly apiogalacturonans, whereas in Wolffioideae the apiogalacturonan content is reduced, and replaced by xylogalacturonan. The authors highlighted a possible evolutionary trend in duckweeds associated with species-dependent variations in apiogalacturonan and xylogalacturonan (Avci, Peña, and O'Neill 2017). Apiose-containing polysaccharides are thought to play a role in the boron binding capacity of duckweeds (Match and Kobayashi 1998) as well as to plant development and growth (Blevins and Lukaszewski 1998; Match and Kobayashi 1998). Relatively little is known about the other cell wall polymers of duckweeds (Zhao *et al.* 2014). Hemicelluloses have been reported to be in small amounts (3%) in duckweed cell walls (Ge *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2014), consistent with the presence of very low lignin levels in duckweed biomass (Blazey and McClure 1968). Venketachalam *et al.* (2013) identified xyloglucans and xylans in the glycome profile of *Lemna*, while cellulose has been reported to be present at 43.7% in *Lemna minor* cell walls (Zhao *et al.* 2014)

In this work, we performed a comparative analysis of growth rates and carbohydrate contents under different light conditions with five species of duckweed from the different genera. We found that under higher light intensity, a condition in which the RGR increases in all species, the faster-growing Lemnoideae species accumulate less starch than the slower-growing Wolffioideae species. At the same time, the higher light intensity increased growth as well as the proportion of apiose in the cell walls of Wolffioideae. Our results suggest that the presence of apiose-containing polymers in cell walls of duckweeds could be related to the growth capacity of duckweed species.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. PLANT MATERIAL, CULTIVATION, AND SAMPLE PREPARATION

Spirodela polyrhiza (9509), *Landoltia punctata* (7624), *Lemna gibba* (DWC128), *Wolffiella caudata* (9139) and *Wolffia borealis* (9144) were obtained from the Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC) collection (Figure 1). Duckweeds were cultivated under axenic conditions in 100 mL of $\frac{1}{2}$ Schenk-Hildebrandt medium (pH 6.5) with 0.5% of sucrose. The plants were grown at 25°C with a photoperiod of 16h of light. Two different light intensities were used: 20 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The cultivated plants were frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. The freeze-dried samples were transferred to 15 mL polycarbonate vials with the screw-on cap including a steel grinding ball of 11 mm that was placed in Geno/Grinder®2010 SPEX SamplePrep for sample processing at 1400 rpm for 2 min or until a fine powder granulometry achieved.

Figure 1. Cladogram of *Lemnaceae* species analyzed in the present study. The five species from different genera of duckweeds are shown according to the phylogeny suggested by Tippery *et al.* (2015). A size bar in each photograph indicate the scale as shown for the different specimen.

2.2. RELATIVE GROWTH RATE MEASUREMENTS

The RGR parameters were calculated according to International Steering Committee on Duckweed Research and Applications (ISCDRA). The growth measurements followed the procedure described by Ziegler (2015). Twenty fronds of *S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, and 50 fronds from *W. caudata* and *W. borealis* were initially inoculated into the culture medium. At the same time, for T_0 (the initial point of analysis) four replicates were harvested for measurements of dry mass. T_7 was harvested after 7 days of growth. Samples were dried at 105°C for 12 hours and weighed to obtain dry mass. RGR was calculated by equation I that was simplified into equation II, where x represents the data of the evaluated parameters (dry mass and number of fronds) and t represents elapsed time (zero - t_0 - and 7 days- t_7).

$$X_t = x_{t_0} * e^{RGR*t} \quad (I)$$

$$RGR = \frac{\ln x_{t_7} - \ln x_{t_0}}{t_7 - t_0} \quad (II)$$

2.3. SOLUBLE CARBOHYDRATE EXTRACTION AND ANALYSIS

Soluble sugars (glucose, fructose, sucrose and raffinose) were extracted four times from 20 mg (dry mass) of pulverized samples with 1.5 mL of 80% ethanol at 80°C for 20 min. The Alcohol Insoluble Residue (AIR) was dried at 45°C overnight. The supernatant was recovered, vacuum concentrated (ThermoScientific® Savant SC 250 EXP) and resuspended in 1 mL of water and 1 mL of chloroform. The soluble sugars (sucrose, fructose, glucose, and raffinose) were analyzed by High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) in a Dionex® system (ICS 5000) using a CarboPac PA1 column and eluted with 150 μ M sodium hydroxide in an isocratic run of 27 min (Supplementary Figure 1).

2.4. STARCH REMOVAL AND DETERMINATION

Starch was measured according to Amaral *et al.* (2007) and Arenque *et al.* (2014). AIR was treated with 120 U/mL of α -amylase (E.C. 3.2.1.1) of *Bacillus licheniformis* (Megazyme® Inc., Australia) diluted in 10 mM MOPS buffer pH 6.5 at 75°C for 1h. Incubation was followed by addition of 30 U/mL of

amyloglucosidase (E.C. 3.2.1.3) of *Aspergillus niger* (Megazyme® Inc., Australia) diluted in 100 mM sodium acetate pH 4.5 at 50°C for 1h. The reactions were stopped by freezing the samples. The supernatants were recovered by centrifugation, and the pellets were washed three times with 80% ethanol and dried at 45°C overnight and reserved for monosaccharides analysis. For starch determination, 5 µL of each sample was diluted with 45 µL of deionized water followed by 250 µL of a mixture containing glucose oxidase (1100U/mL), peroxidase (700 U/mL), 4-aminoantipirin (290 µmol/L) and 50 mM of phenol at pH 7.5. The plates were incubated for 15 min at 30°C and the absorbance was measured at 490nm. The calibration curve was performed with commercial glucose (Sigma®) in the concentration range of 0.02-0.2 mg/mL.

2.5. MONOSACCHARIDE COMPOSITION

Five mg of the cell wall (de-starched AIR) was hydrolyzed with 1 mL of 2M trifluoroacetic acid (TFA) for 1 h at 100°C. The reaction mixture was dried under vacuum and resuspended in 1 mL of deionized water. This was followed by filtration on 0.22 µm (Merk Millipore ®) filters. The released monosaccharides were analyzed by HPAEC-PAD through the injection of 10 µL hydrolysate into a CarboPac SA10 column (ICS 5.000 system, Dionex-Thermo®). The column was eluted isocratically with 99.2% of water and 0.8% (v/v) sodium hydroxide (1 mL/min). The monosaccharide release from the cell wall were detected using a post-column base containing 500 mM NaOH (0.5 mL/min). The standards used were apiose, arabinose, fucose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, and xylose (Supplementary Figure 1). Quantification was performed by injections of samples with known concentrations for each monosaccharide to calibrate the instrument.

2.6. URONIC ACID DETERMINATION

The total uronic acid was quantified according to Filisetti-Cozzi and Carpita (1991). Five mg of each de-starched cell wall were weighed and 2 mL of concentrated sulfuric acid were added. The reactions were incubated for 10 min on ice under stirring (1250 rpm), followed by addition of 1 mL of deionized water. This procedure was repeated once. The incubated mixtures were diluted to 10 mL and centrifuged at 4,000 g for 10 min at room temperature. Forty µL of 4M sulfamic acid/potassium sulfamate solution (pH 1.6) and 2.4 mL of 75 mM sodium

borate in sulfuric acid was added to aliquots of supernatant (400 μ L). The homogenized solutions were incubated at a 100°C for 20 min, then cooled on ice for 10 min. Eighty μ L of m-hydroxybiphenyl in 0.5% NaOH were added and vortexed for color development. The samples were read at 525 nm in Spectrophotometer Genesys 10S UV-VIS ThermoScientific®. A standard curve using D-galacturonic acid was performed in the concentration range of 5-40 μ L/400 μ L.

2.7. STATISTICAL ANALYSIS

Four replicates were used for the experiments. Interspecific analyses were performed by ANOVA one-way followed by Tukey's test ($p < 0.05$). A t-test was used to compare different light conditions. The analyses were carried out using JMP® software version 5.1 or R version 3.2.2. Principal Component Analysis was performed using Minitab software version 14 with all data for low light and high light treatments. General Linear Model (GLM) was used to evaluate the significance of each principal component (Supplementary Table 2).

3 RESULTS

3.1. RELATIVE GROWTH RATES

We first compared the RGR between the five species of duckweed under illumination at intensity of 20 μ moles $m^{-2} s^{-1}$. Using either dried weight (RGR-D, Figure 2A) or frond number (RGR-F, Figure 2B) as the basis for RGR calculation, we found that the rates for the two Wolffioideae species (*W. caudata* and *W. borealis*) were significantly lower (0.1-0.14 day^{-1}) than the other species of the Lemnoideae (0.14-0.24 day^{-1}). In contrast, when compared under higher light intensity of 500 μ moles $m^{-2} s^{-1}$, RGR-F measurement continue to show lower growth rates for the Wolffioideae (Figure 2D) while RGR-D measurements showed equally high growth rates for all five species of duckweed (Figure 2C).

Figure 2. Comparison of relative growth rate (RGR) for different duckweed strains (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* and *W. borealis*) cultivated under two light intensities ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Values are average $\pm$ standard error evaluated per dry mass (A and E) and the number of fronds (B and D). Panels A and B show data from low light condition while panels C and D represent data from high light condition. Means followed by the same letters are statistically significant among the five-species compared according to Tukey's test ($p < 0.05$).

Quantifying the effects of light intensity on these parameters for each species revealed that RGR-D increased the most for the Wolffioideae under higher light intensities, being at around 50% for *S. polyrhiza* (53.9%) and *L. punctata* (42.7%) and more than doubling for *L. gibba* (147.9%), *W. caudata* (203.4%) and tripling for *W. borealis* (218.6%). Since the frond number increase (RGR-F) in the Wolffioideae continues to be below that of the Lemnoideae (Figure 2D), our results indicate that the fronds of Wolffioideae produced under higher light must be higher in dry mass than the Lemnoideae fronds, thus resulting in similar RGR-

D under high light (Figure 2C). One possible cause for this would be a higher starch content in the Wolffioideae than the Lemnoideae under this condition.

3.2. DUCKWEED CARBOHYDRATES

Figure 3 shows a comparison of the carbohydrate composition for each species of duckweed grown under low ($20 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high light intensity ($500 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) conditions. Two different statistical approaches were taken. One compares the differences among species (ANOVA One-way) under the two light conditions (Supplemental Table 1), and the other compares effects of light on each species, using a t-test for the two light treatments (Table 1). With respect to the species studied in this work, light intensity had relatively small effects on carbohydrate partitioning in terms of starch and soluble sugars (Figure 3, Supplemental Table 1). On average, accounting only for the carbohydrates, soluble sugars represented 17.1%, starch 6.4%, and cell walls 47.9% of the biomass (Figure 3, Supplemental Table 1). Other components such as lipids, proteins, and secondary metabolites accounted for about 28.6% (Figure 3). As reported by previous workers, we found a constant low level of 3% lignin in these aquatic plants, irrespective of the light conditions and relative growth rates (data not shown).

Figure 3. Comparative composition of duckweeds (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* and *W. borealis*) biomass cultivated under low light ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and high light ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) intensity. Values are averages from the percentages of dry mass. Soluble sugars are the sum of the contents of sucrose, fructose, raffinose, and glucose. Cell walls are the residual portion of de-starched AIR. (n=4).

Table 1 shows the carbohydrate composition of the five species of duckweeds used in this work. Under high light, sucrose and raffinose increased in most of the species studied, while fructose and glucose decreased in the Lemnoideae and increased in Wolffioideae. An exception was *W. caudata*, for which glucose and raffinose decreased significantly under high light (Table 1). High light induced starch accumulation only in Wolffioideae (Supplemental Table 1 and Table 1). This is seen in Supplemental Table 1, where statistical differences between Lemnoideae and Wolffioideae were significant only in high light. The analysis of cell wall components under the two light treatments revealed the following trends upon increase in light intensity: 1) uronic acids decreased for most species except for *L. punctata*, where the main features were a significantly lower uronic acids and a higher mannose content in low light in comparison with the other species; 2) all the monosaccharides except for mannose and glucose decreased in Lemnoideae species whereas we observed an increase in most of them in Wolffioideae.

Table 1. Sugar composition of duckweeds (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* and *W. borealis*) biomass ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ dry mass) cultivated under low light ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and high light ($500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) intensities. Data are given as averages $\pm$ standard errors. p-values ($p < 0.05$) that are statistically significant are presented in bold ($n=4$).

			<i>S. polyrhiza</i>	<i>L. punctata</i>	<i>L. gibba</i>	<i>W. caudata</i>	<i>W. borealis</i>
Nonstructural carbohydrates ($\mu\text{g}/\text{mg DM}$)	Glucose	LL	5.03 ± 2.11	2.64 ± 0.40	6.10 ± 2.19	4.00 ± 0.45	5.12 ± 1.04
		HL	2.66 ± 0.19	1.63 ± 0.17	4.54 ± 0.55	2.40 ± 0.25	12.38 ± 4.84
		P	0.306	0.061	0.515	0.020	0.193
	Fructose	LL	6.51 ± 3.01	4.33 ± 0.72	5.67 ± 2.14	3.99 ± 0.41	6.37 ± 1.19
		HL	2.89 ± 0.32	1.84 ± 0.19	5.80 ± 0.72	5.19 ± 0.87	17.03 ± 5.83
		P	0.276	0.015	0.953	0.259	0.124
	Sucrose	LL	5.47 ± 2.21	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.17 ± 0.02
		HL	8.81 ± 0.65	6.48 ± 0.50	11.02 ± 0.58	14.26 ± 2.25	5.66 ± 0.22
		P	0.198	0.000	0.000	0.001	0.000
	Raffinose	LL	0.22 ± 0.10	0.01 ± 0.01	0.21 ± 0.11	0.89 ± 0.12	0.02 ± 0.01
		HL	0.68 ± 0.08	6.90 ± 0.51	3.85 ± 0.53	0.19 ± 0.06	0.12 ± 0.03
		P	0.011	0.000	0.001	0.002	0.018
	Starch	LL	55.23 ± 13.88	11.97 ± 0.69	74.04 ± 23.61	66.49 ± 18.77	94.71 ± 21.94
		HL	32.95 ± 1.98	18.56 ± 3.19	6.88 ± 0.21	106.88 ± 20.61	171.54 ± 27.67
		P	0.163	0.090	0.029	0.198	0.073
Structural carbohydrates ($\mu\text{g}/\text{mg DM}$)	Uronic acids	LL	184.96 ± 17.64	66.98 ± 5.85	169.86 ± 18.18	180.36 ± 17.53	226.82 ± 33.34
		HL	127.57 ± 12.73	174.51 ± 18.79	143.77 ± 16.41	140.65 ± 36.66	123.24 ± 14.33
		P	0.039	0.002	0.061	0.045	0.147
	Fucose	LL	1.54 ± 0.12	1.19 ± 0.21	0.98 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.42 ± 0.16
		HL	1.14 ± 0.06	0.53 ± 0.13	0.67 ± 0.02	1.25 ± 0.25	1.74 ± 0.27
		P	0.026	0.040	0.003	0.497	0.343
	Apiose	LL	7.27 ± 0.90	19.47 ± 3.61	15.80 ± 0.75	3.61 ± 0.71	1.94 ± 0.27
		HL	5.42 ± 0.34	14.64 ± 0.72	10.16 ± 1.13	7.00 ± 1.85	3.23 ± 0.36
		P	0.103	0.238	0.006	0.139	0.030
	Xylose	LL	8.47 ± 0.38	23.20 ± 4.48	18.26 ± 0.73	13.92 ± 0.78	15.98 ± 0.65
		HL	6.94 ± 0.31	12.63 ± 4.03	14.57 ± 1.86	24.33 ± 5.39	27.19 ± 4.20
		P	0.020	0.130	0.115	0.104	0.039
	Arabinose	LL	11.57 ± 1.02	10.34 ± 1.91	6.17 ± 0.15	28.76 ± 4.72	14.46 ± 0.65
		HL	9.78 ± 0.71	4.03 ± 1.10	5.64 ± 0.48	39.05 ± 7.02	23.80 ± 3.23
		P	0.203	0.028	0.336	0.270	0.030
	Galactose	LL	13.80 ± 0.77	12.78 ± 2.62	8.91 ± 0.20	9.96 ± 0.89	8.68 ± 0.73
		HL	11.63 ± 0.81	6.96 ± 2.22	8.35 ± 0.61	11.60 ± 2.19	11.61 ± 1.87
		P	0.101	0.142	0.420	0.516	0.196
	Rhamnose	LL	3.88 ± 0.24	3.26 ± 0.70	2.36 ± 0.08	1.72 ± 0.14	2.40 ± 0.21
		HL	3.23 ± 0.18	1.69 ± 0.53	1.88 ± 0.17	2.31 ± 0.58	2.37 ± 0.33
		P	0.073	0.124	0.050	0.364	0.950
	Glucose	LL	3.39 ± 0.44	3.05 ± 0.45	3.02 ± 0.71	5.07 ± 0.81	4.74 ± 1.46
		HL	9.02 ± 1.08	2.96 ± 0.92	4.76 ± 1.30	14.27 ± 3.49	17.96 ± 3.95
		P	0.003	0.932	0.284	0.043	0.020
	Manose	LL	1.95 ± 0.16	8.63 ± 1.78	0.91 ± 0.07	1.35 ± 0.17	1.76 ± 0.21
		HL	1.50 ± 0.26	0.91 ± 0.26	1.15 ± 0.08	1.42 ± 0.30	1.55 ± 0.28
		P	0.195	0.005	0.061	0.847	0.568

Figure 4 and Table 1 show the trends in apiose in the cell walls for the species studied. There is a significant trend towards higher apiose content in Lemnoideae in comparison with Wolffioideae. Furthermore, under higher light intensity, there was a trend towards a decrease in apiose for Lemnoideae (significant for *L. gibba*) in contrast to the inverse trend towards higher apiose observed with the two Wolffioideae species (more significantly for *W. borealis*) (Figure 4). The apiose content evaluated was only structural, found in the pectins.

Figure 4. Comparative analysis of the apiose content in the cell walls of duckweeds (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* and *W. borealis*) cultivated under two light intensity (20 and 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) conditions. Data are the averages $\pm$ standard errors ($n=4$). Letters in capital on top of darker bars are the significant differences by Tukey's test ($p<0.05$) for low light. Lowercase letters on top of grey bars mean significant differences regarding high light. Asterisks indicate significant differences by t-test ($p<0.05$) for species in two light intensities.

Principal Component Analysis (**Figure 5**) using all the variables confirmed the observations above and revealed that starch and apiose contents are negatively correlated. In the case of low light, this can be explained by the higher capacity of growth with *S. polyrhiza* (**Figure 5A**), which could be the reason for its clear separation from all the other species tested (PC2). However, under high light (**Figure 5B**), the species from Lemnoideae, which has higher apiose content, propagated faster (RGR-F), whereas the Wolffioideae species grew slower (RGR-F), concomitant with accumulating higher amounts of starch.

Figure 5. Principal Component Analysis (PC1 and PC2) of duckweeds (*S. polyrhiza*, *L. punctata*, *L. gibba*, *W. caudata* and *W. borealis*) grown under two light intensities. (A) low light ($20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and (B) high light ($500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Xylose, apiose, mannose, arabinose, glucose, galactose, and rhamnose are cell wall-related monosaccharides, uronic acids (uronics) is a component of pectin and some hemicelluloses, starch and SS (Soluble Sugars) represent non-structural carbohydrates, and RGR (Relative Growth Rate) based on number of fronds (RGR-F) and dry mass (RGR-D). The vector values and statistical analyses are in the Supplementary Table 2. (n=4)

4 DISCUSSION

In this study, we found significant differences between Lemnoideae and Wolffioideae regarding growth, starch content and cell wall components. For the most part, both subfamilies of duckweed follow the pattern known for most plant species, i.e., that lower starch content is correlated with higher growth rates (Schulze *et al.* 1991; Sulpice *et al.* 2009; Zeeman, 2015). However, our study revealed that Lemnoideae apparently differs from Wolffioideae by displaying higher growth rates with relatively low starch contents under high light condition, while *W. borealis* and *W. caudata* (Wolffioideae) display growth limitation under higher light conditions with a concomitant increase in starch accumulation (Figures 2C and 2D.). Our results suggest that the increase in biomass of Wolffioideae under high light is not solely due to an increase in the number of fronds but may be driven largely by the fact that the fronds become heavier due to the accumulation of starch (Table 2, Supplementary Table 1). Thus, there seems to be a limitation for growth that is unrelated to light quantity and possibly associated with the internal control of carbon allocation and/or photosynthetic capacity. It is important to note that non-structural carbohydrates may vary considerably in duckweeds growing in the wild. Indeed, Xiao *et al.* (2013) compiled data and found that starch in duckweeds can vary from 3 to 75%. The authors concluded that this variation is probably due to geographical location and nutritional factors. Despite the fact that variations in the wild can occur, this is not valid for the interpretation of our results, since the species used in this work were cultivated under the same controlled conditions.

Duckweed biomass has been reported to display higher proportions of soluble compounds, which contrasts with the relatively lower proportions of structural carbohydrates (Xu *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2013; Yin *et al.* 2015; Li *et al.* 2016). However, our study revealed that structural carbohydrates make up almost half of the biomass in all species analyzed (Figure 3). The cell wall of duckweeds has been thought to display higher percentages of pectin (Avci, Peña, and O'Neill 2017). Duff (1965) was the first to report apiose occurrence in duckweed. This five-carbon sugar was found by Hart and Kindel (1970) as a major constituent of apiogalacturonan in duckweeds (*Lemna minor*). More recently, Avci *et al.* (2017) determined the structure of several pectic

polysaccharides (rhamnogalacturonans, apiogalacturonan, and xylogalacturonan) from 12 species of duckweed and found that the ones from the subfamily Wolffioideae contain lower proportions of apiogalacturonan. These authors also highlight that there is a trade-off between apiogalacturonan and xylogalacturonan in duckweeds, with the latter polysaccharide being higher in Wolffioideae. Xylose can be found in xylans, xyloglucan, arabinoxylans, rhamnogalacturonan, and xylogalacturonan (Guyett *et al.* 2009; Bar-Peled, Urbanowicz, and O'Neill 2012). This sugar is reported to be lower in duckweeds (Ge *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2014). However, in the present study, we found that xylose represented approximately 22% of the cell wall ($82.84 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DM}$), decreasing in Lemnoideae (0.68 times) and increasing in Wolffioideae (1.7 times) with an increase in light intensity during growth (Table 2, Figure 5). It would be interesting to examine the molecular basis for this variation and the biochemical consequences in terms of cell wall architectural differences between these subfamilies. The recently reported high-quality reference genome for *S. polyrhiza* (Michael *et al.* 2017) and the soon-to-be completed *Wolffia australiana* genome (E. Lam, unpublished work) may help to shed light on this aspect.

It has been hypothesized that the presence of apiose (i.e., apiogalacturonans) in duckweeds can be related to their expected need to efficiently assimilate boron (Matoh 1997) due to the known ability of apiose to specifically form complexes with boron in plant cell walls (Matsunaga *et al.* 2004; Feischer *et al.* 1998). While apiose is present in rhamnogalacturonan II of plants, the existence of apiogalacturonan appears to be unique to aquatic plants such as duckweed (Hart and Kindel 1970; Mohnen 2008). We thus hypothesize that the presence of significant amounts of apiogalacturonan in duckweed cell walls could be an evolutionary adaptation of this family of aquatic plants to thrive in their habitat. Since aquatic environments usually have a concentration of boron that is 300 times lower than the average in terrestrial environments (Shorrocks, 1997; Power & Woods, 1997; Lemarchand *et al.* 2000), it would be reasonable to think that the concentration of apiogalacturonan in the cell walls could be an adaptive factor related to their rapid growth on the water surface.

In addition to the potential relationship with boron adsorption, it is also known that reduced cross-links in rhamnogalacturonan II are related to decreased plant growth (Ishii, Matsunaga, and Hayashi 2001). The recent report

that the structure and cross-linking of this polysaccharide in Lemnoideae and Wolffioideae is conserved (Avci, Peña, and O'Neill 2017) further strengthens the hypothesis for the positive contribution of apiogalacturonans to enhanced duckweed growth.

In the present study, a trade-off between the accumulation of starch and apiose (probably apiogalacturonan) has been observed, with higher starch and low apiose levels in Lemnoideae and the reverse trend in Wolffioideae. This was found for 4 out of the 5 species studied. The exception to this was *L. punctata*, in which starch did not vary under different light intensities and uronic acids was rather low under low light. A possible explanation to these findings (see Figure Supplemental 3 for some of the possible metabolic pathways present in duckweeds) is that the light intensity used in our experiment was far too low for *L. punctata*, leading to a carbon flow that, although still supporting some growth, did not afford the cell walls to establish two of their substantial carbohydrate sinks (starch and pectins). The absence of increase in starch in the non-structural carbohydrate pool, at the same time as the comparatively low uronic acids levels in the cell walls of *L. punctata*, is consistent with the hypothesis that there has been deviation of carbon metabolism towards the GDP-mannose pathway in *L. punctata* under low light. This hypothesis is corroborated by the observation of a 10-fold higher accumulation of mannose in the walls of *L. punctata*.

For the other four species, with higher light intensity more apiose was found in Wolffioideae species with a concomitant increase in their growth rates. Nevertheless, their growth rates in terms of development (RGR-F) were still lower and their starch content higher when compared to those of the three Lemnoideae (except for *L. punctata* in this work) species studied under the same conditions. In the Lemnoideae species, where apiose is usually high even when grown under low light intensity, their higher growth rates were consistent with lower accumulation of starch as well.

In sum, our results suggest that apiogalacturonans in duckweeds may be a rate-limiting factor for growth of duckweeds, especially in species belonging to the subfamily of Wolffioideae. If proven true in further screening of additional species and accessions in this subfamily of duckweeds, the levels of apiose and apiogalacturonans may be useful biomarkers for identification of high growth rate duckweed strains for commercial applications.

5 REFERENCES

- AMARAL, L. I. V. *et al.* Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.
- APPENROTH, K. J.; BORISJUK, N.; LAM, E. Telling duckweed apart: Genotyping technologies for the Lemnaceae. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2013.
- ARENQUE, B.C. *et al.* Responses of *Senna reticulata*, a legume tree from the Amazonian Floodplains, to elevated atmospheric CO₂ concentration and waterlogging. **Tress - Structural and Function**, v. 28, n.4, p.1021-34, 2014.
- AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, n. 123456789, 2017.
- BLAZEY, E.B.; McCLURE, J.W. The distribution and taxonomic significance of lignin in the Lemnaceae. **Amer. J. Bot.**, v.55, p.1240-45, 1968.
- BAR-PELED, M.; O'NEILL, M. A. Plant Nucleotide Sugar Formation, Interconversion, and Salvage by Sugar Recycling*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 127–155, 2011.
- BAR-PELED, M.; URBANOWICZ, B. R.; O'NEILL, M. A. The Synthesis and Origin of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II – Insights from Nucleotide Sugar Formation and Diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. May, p. 1–12, 2012.
- BLEVINS, D. G.; LUKASZEWSKI, K. M. Boron in Plant Structure and Function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 481–500, 1998.
- BORISJUK, N. *et al.* Assessment, validation and deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed species. **Plant Biology**, v. 17, p. 42–49, 2015.
- BUCKERIDGE, M. S. The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. **Biosystems**, 2017.
- CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron in plants: Deficiency and toxicity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1247–1255, 2008.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.
- DUFF, R.B. The occurrence of apiose in *Lemna* (duckweed) and other angiosperms. **Biochemistry J.**, v.94, n.3, p.768-772, 1965.

- FEISHER, A.; TITEL, C.; EHWALD, R. The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium álbum* L. cells. **Plant Physiology**, v.117, n.4, p.1401-1410, 1998.
- FERNANDEZ, O. *et al.* Leaf Starch Turnover Occurs in Long Days and in Falling Light at the End of the Day. **Plant Physiology**, v. 174, n. 4, p. 2199–2212, 2017.
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference of neutral sugars. **Analytical Biochem.**, v.197, n.1, p.157-62, 1991.
- GE, X. *et al.* Growing Lemna minor in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 485–488, 2012.
- GUYETT, P. *et al.* Real-time NMR monitoring of intermediates and labile products of the bifunctional enzyme UDP-apiose/UDP-xylose synthase. **Carbohydrate Research**, v. 75, n. 5, p. 1781–1791, 2009.
- HART, D. A; KINDEL, P. K. Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of Lemna minor. **The Biochemical journal**, v. 116, n. 4, p. 569–579, 1970.
- ISHII, T.; MATSUNAGA, T.; HAYASHI, N. Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. **Plant Physiol.**, v. 126, n. 4, p. 1698–1705, 2001.
- KALLURI, U. C.; KELLER, M. Bioenergy research: a new paradigm in multidisciplinary research. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. 51, p. 1391–1401, 2010.
- LEMARCHAND, D. *et al.* The influence of rivers on marine boron isotopes implications for reconstructing past ocean pH. **Nature**, v.408, p.951-54, 2000.
- LANDOLT, E. **Lemnaceae Duckweed Family** *Journal of the Arizona-Nevada academy of science*, 1992.
- LES, D. H. D. *et al.* Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. **Systematic Botany**, v. 27, p. 221–240, 2002.
- LI, Y. *et al.* Positive effects of duckweed polycultures on starch and protein accumulation. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 5, p. e00380–e00380, 2016.
- MATOH, T. Boron in plant cell walls. **Plant and Soil**, v. 193, n. 1, p. 59–70, 1997.
- MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 179–190, 1998.
- MATSUNAGA, T. *et al.* Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. **Plant physiology**, v. 134, n. 1, p. 339–351, 2004.

MENGIN, V. *et al.* Photosynthate partitioning to starch in *Arabidopsis thaliana* is insensitive to light intensity but sensitive to photoperiod due to a restriction on growth in the light in short photoperiods. **Plant, Cell & Environment**, v.40, n.11, p.2608-27, 2017.

MICHAEL, T.P. *et al.* Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrrhiza* by high-depth physical mapping and short-read DNA sequencing strategies. **The Plant Journal**, v.89, n.3, p.617-635.

MIWA, K.; FUJIWARA, T. Boron transport in plants: Co-ordinated regulation of transporters. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1103–1108, 2010.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MØLHØJ, M.; VERMA, R.; REITER, W. D. The biosynthesis of the branched-chain sugar D-apiose in plants: functional cloning and characterization of a UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase from *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 35, n. 3, p. 1781–1791, 2003.

O'NEILL, M. A *et al.* Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 109–139, 2004.

POWER, P.P.; WOODS, W.G. The chemistry of boron and speciation in plants. **Plant Soil**, v. 193, p.1-13, 1997.

SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: Towards a molecular understanding of their design principles. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3615–3635, 2009.

SCHULZE, W. *et al.* A Quantification of the Significance of Assimilatory Starch for Growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 890–895, 1991.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, 2007.

SORROCKS, V. The occurrence and correction of boron deficiency. **Plant Soil**, v. 193, p.121-148, 1997.

SULPICE, R. *et al.* Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10348–10353, 2009.

TIPPERY, N.; LES, D.; CRAWFORD, D. Evaluation of phylogenetic relationship in Lemnaceae using nuclear ribosomal data. **Plant Biology**, v.17, p.50-58, 2015.

VAUGHAN, D. *et al.* The Use of Chemical and Infra-red Spectral Analyses to Verify the Identification of Two Species of Duckweed , *Lemna minor* L . and *Lemna gibba* L . Grown Under Defined Conditions. v. 43, n. 251, p. 865–870, 1992.

VENKETACHALAM, S. *et al.* Analyses of Cell Wall Glycans Using Glycome Profiling in Two Commercially Important Lignocellulosic Fiber Raw Materials. **Journal of Textile Science & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 1–4, 2013.

VERBANČIČ, J. *et al.* Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. **Molecular Plant**, n. January, p. 75–94, 2017.

XIAO, Y. *et al.* Culturing duckweed in the field for starch accumulation. **Industrial Crops and Products**, v. 48, n. October 2015, p. 183–190, 2013.

XU, J. *et al.* Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. **Biosystems Engineering**, v. 110, n. 2, p. 67–72, 2011.

YIN, Y. *et al.* The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 84–90, 2015.

YU, C. *et al.* Comparative analysis of duckweed cultivation with sewage water and SH media for production of fuel ethanol. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014.

ZEEMAN, S.C. Carbohydrate metabolism. In: Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Eds). American Society of Plant Physiologists, p. 567-610, 2015.

ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A. M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 209–234, 2010.

ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M.; SMITH, A. M. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 13–28, 2007.

ZIEGLER, P.; ADELMANN, K.; ZIMMER, S.; SCHMIDT, C.; APPENROTH, K.J. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants. **Plant Biology**, v. 17, p. 33–41, 2015.

ZHAO, X. *et al.* Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (Lemna minor). **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 410–418, 2014.

6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 1. Typical chromatograms obtained from- High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detetion of alcohol soluble sugars (A) and cell wall monosaccharides (B) evaluation. A. Sugars analysis in a Dionex system (ICS 5000) with a CarboPac PA1 column that was eluted with 150 mM sodium hydroxide and water in a flux of 1 mL/min, which 50% of the elluents were applied in the first 17 min (sugars separation), after that 100% of NaOH was applied for 5 min to clean the column and then 5 min of water to regenerate the column. **B.** Monosaccharides were separated and identified in a Dionex system (ICS 5000) with a CarboPac SA10 eluted with 0.8% sodium hydroxide and water in a flux of 1 mL.min-1. The separation was in the first 12 min, followed by addition of 200 mM NaOH 75% to wash the column (10 min) and then 150 mM NaOH 0.8% was incorporated to regeneration.

A **B**

Supplementary Figure 2. Examples of chromatograms obtained for duckweed sugar analyses. A. Separation of soluble sugars (Glucose, Fructose, Sucrose and Raffinose) of *Landoltia punctata* in High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) in a CarboPac PA1 column. **B.** Monosaccharides evaluation of *Wolffia borealis* in CarboPac SA10 column on HPAECPAD.

Supplementary Figure 3. Schematic metabolic pathway of the cell wall and non-structural sugars precursors. The sugar precursors are presented in black. The cell wall sugar monosaccharides that make up the cell wall polysaccharides are in red while the non-structural sugars are in blue. The pectins group are represented in purple and the hemicellulosic in green. The starch synthesis occurs from the ADP-glucose pathway in chloroplast after the derivation of the carbon assimilated into glucose-1-phosphate. The soluble and cell wall sugars synthesis depends on the UDP-glucose pathway formed via fructose-6-phosphate (photosynthetic product) which is converted to nucleotide sugars (UDP-Arabinose, UDP-Rhamnose, UDP-Glucuronic acid, and UDP-Galactose). The pectins are derived from galacturonic acids having as main precursor UDP-glucuronic acid and UDP-galactose besides UDP-glucose. As there are different classes of the pectins with different sugars in their composition the metabolic route of the synthesis of these involves the precursors of apiose, arabinose, rhamnose, xylose and galactose. The hemicellulose is formed from pentoses and hexoses linked to form mannans, xyloglucans, xylans, and arabinans. The mannans and fucose are derived directly from the fructose-6-phosphate precursor, whereas the xylans, xyloglucans and arabinans are from UDP-glucose. The cellulose is build up directly from UDP-glucose precursor. Sucrose is a disaccharide formed by glucose and fructose by the precursors fructose-6-phosphate and UDP-glucose. Raffinose is derived from UDP-galactose.

Source: Adaptations of Alonso *et al.* (2010), Carpita *et al.*, (2015), Verbančič *et al.* (2017), and metabolic pathways KEGG 00051 (fructose metabolism and mannose), 00052 (metabolism galactose), 00500 (metabolism starch and sucrose) and 00520 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism).

Abbreviations: Fru – fructose, Glc-Glucose, Suc- sucrose, Ara-arabinose, Api- apiose, Fuc- Fucose, Gal – galactose, GlcA – glucuronic acid, Man – mannose, Rha – rhamnose, GalA- galacturonic acid, Xyl – xylose, RG I- rhamnogalacturonan type I, RG-II rhamnogalacturonan type II, XG – xyloglucan, HG – homogalacturonan, AP – apiogalacturonan, and XGA – xylogalacturonan.

Supplementary Table 1. Analysis for duckweed biomass composition data (from Figure 3).

Values of the columns represent a standard mean $\pm$ standard error (n=4). Statistics analysis were performed with ANOVA one-way for each light intensity and sugar separately (p-value is shown). The variance analysis followed Tukey's comparison of means per sugar (column) with highlighted letters in bold fonts indicate the significant values in confidence interval of 95% or more.

Treatment	Species	% Cell wall	% Soluble sugars	% Starch	%Others
Low light	<i>S. polyrhiza</i>	50.16 $\pm$ 1.64 ^b	17.24 $\pm$ 4.26	5.52 $\pm$ 1.38 ^{ab}	27.07 $\pm$ 5.59
	<i>L. punctata</i>	58.84 $\pm$ 0.80 ^a	7.02 $\pm$ 1.08	1.19 $\pm$ 0.07 ^b	32.93 $\pm$ 1.89
	<i>L. gibba</i>	51.33 $\pm$ 1.76 ^b	12.05 $\pm$ 4.38	7.40 $\pm$ 2.36 ^{ab}	29.21 $\pm$ 3.18
	<i>W. caudata</i>	48.42 $\pm$ 17.4 ^b	8.85 $\pm$ 0.98	6.65 $\pm$ 1.88 ^{ab}	35.97 $\pm$ 2.17
	<i>W. borealis</i>	47.74 $\pm$ 0.63 ^b	11.68 $\pm$ 2.26	9.47 $\pm$ 2.19 ^a	31.10 $\pm$ 1.94
	<i>p-value</i>	0.000	0.209	0.054	0.373
High light	<i>S. polyrhiza</i>	36.23 $\pm$ 0.84	15.04 $\pm$ 1.12	3.29 $\pm$ 0.19 ^b	45.43 $\pm$ 1.59 ^b
	<i>L. punctata</i>	40.67 $\pm$ 1.72	16.85 $\pm$ 1.35	1.85 $\pm$ 0.32 ^b	40.61 $\pm$ 1.41 ^{ab}
	<i>L. gibba</i>	41.67 $\pm$ 1.41	25.21 $\pm$ 2.36	0.68 $\pm$ 0.02 ^b	32.43 $\pm$ 2.49 ^{abc}
	<i>W. caudata</i>	43.16 $\pm$ 7.18	22.03 $\pm$ 3.34	10.69 $\pm$ 2.06 ^a	24.11 $\pm$ 6.14 ^{bc}
	<i>W. borealis</i>	30.63 $\pm$ 3.38	35.19 $\pm$ 10.82	17.53 $\pm$ 2.76 ^a	17.02 $\pm$ 5.59 ^c
	<i>p-value</i>	0.164	0.103	0.000	0.000

Supplementary Table 2. Statistics and variance proportions corresponding to axis (PC1 and PC2) generated by Principal Component Analysis from sugars and growth rate (RGR) values for five species of duckweeds. SS: soluble sugars, RGR-D: relative growth ratio based upon dry mass, RGR-F: relative growth ratio based upon number of fronds, others (starch, arabinose, fucose, glucose, mannose, rhamnose, xylose, apiose and uronic) are carbohydrates measured (n=4).

	Low light		High Light	
	PC1	PC2	PC1	PC2
F	91.450	21.750	8.29	5.37
p-value	0.000	0.000	0.001	0.007
R-Sq (adj)	95.01%	81.37%	60.54%	47.94%
Eigenvalue	4.950	2.371	6.113	2.234
Proportion	0.381	0.182	0.470	0.172
Cumulative	0.381	0.563	0.470	0.642
SS	0.045	-0.415	0.137	0.285
Starch	0.256	-0.212	0.259	0.357
Arabinose	0.185	0.061	0.343	0.159
Fucose	-0.128	-0.416	0.388	-0.047
Galactose	-0.317	-0.245	0.347	-0.31
Glucose	0.142	-0.07	0.376	0.018
Mannose	-0.38	0.168	0.326	-0.334
Rhamnose	-0.339	-0.37	0.253	-0.479
Xylose	-0.249	0.335	0.338	0.134
Apiose	-0.379	0.219	-0.219	-0.11
Uronics	0.297	-0.334	-0.018	0.254
RGR-D	-0.336	-0.275	0.063	-0.084
RGR-F	-0.307	-0.172	-0.219	-0.474

9. ANEXOS

Anexo 1. Composição meio de cultura Shenk-Hildebrandt (Sigma-Aldrich®)

Componentes (mg/L)	
Fosfato de amônio monobásico ((NH ₄)H ₂ P ₄)	300,0
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	5,0
Cloreto de cálcio anidro (CaCl ₂)	151,0
Cloreto de cobalto • 6H ₂ O (CoCl ₂ • 6 H ₂ O)	0,1
Sulfato cúprico • 5H ₂ O (CuSO ₄ • 5 H ₂ O)	0,2
Na ₂ -EDTA (Na ₂ -C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	20,0
Sulfato ferroso • 7H ₂ O (FeSO ₄ • 7 H ₂ O)	15,0
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	195,4
Sulfato de manganês • H ₂ O (MnSO ₄ • H ₂ O)	10,0
Ácido molibdico • 2 H ₂ O (H ₂ MoO ₃ • 2H ₂ O)	0,1
Iodeto de potássio (KI)	1,0
Nitrato de potássio (KNO ₃)	2.500,0
Sulfato de zinco • 7 H ₂ O (ZnSO ₄ • 7 H ₂ O)	1,0
<hr/>	
Gramas do pó para fazer 1 L	3,2
pH temperatura ambiente	4,0-5,0