UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

IAQUINE SANTOS DA SILVA

Transcriptômica da via de biossíntese dos monolignóis ao longo do desenvolvimento dos entrenós de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

Lorena

2019

IAQUINE SANTOS DA SILVA

Transcriptômica da via de biossíntese dos monolignóis ao longo do desenvolvimento dos entrenós de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área Microbiologia aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Elisson Antônio da Costa Romanel

Versão Corrigida

Lorena

2019

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Iaquine Santos da
Transcriptômica da via de biossíntese dos monolignóis ao longo do desenvolvimento dos entrenós de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) / Iaquine Santos da Silva; orientador Elisson Antônio da Costa Romanel - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
66 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Cana-de-açucar. 2. Lignina. 3. Monolignol. I. Título. II. Romanel, Elisson Antônio da Costa, orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa conquista e por sempre me proteger e me guiar em todos os momentos da minha vida. A ti devo tudo, Senhor.

Aos meus pais, Dulciene e Jenilson, por terem me dado com toda dedicação, paciência e amor todas as ferramentas para que eu me tornasse quem eu sou, e por sempre me apoiarem. E as minhas irmãs Isabela e Yasmin, minhas melhores amigas, por estarem sempre comigo, mesmo a distância, tornando os meus dias sempre mais bonitos. Eu amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Elisson Romanel pela oportunidade, pelo tempo dedicado a aprimorar minha formação e ainda mais pela compreensão e paciência em todos os momentos, especialmente os mais difíceis. E a professora Tatiane da Franca por toda ajuda e cooperação nesses dois anos de convivência. Eu aprendi muito com vocês.

Aos professores, Maria das Graças Felipe, Adriane Milagres e André Ferraz pelos direcionamentos e disponibilidade em me ajudar tanto dentro de sala de aula como fora dela.

Aos meus amigos de laboratório, Karol, Luís, Amanda, Ailton por todos os momentos de troca de conhecimento, discussão e gargalhadas. Em especial a Lari, por estar sempre esta disposta a me auxiliar da melhor forma possível.

À todos os amigos que estiveram comigo durante essa jornada. A minha amiga de uma vida inteira, Awana, pela amizade, apoio em todos os momentos. A minha amiga-irmã, Ana Karolina, pelo carinho e incentivo durante essa caminhada. A minha amiga, Liza, por ter me recebido em sua casa e por toda amizade dedicada a mim. A minha sobrinha "de coração" Isis por tornar os meus dias mais coloridos. Agradeço a Deus por ter me presenteado com vocês.

As agencias de fomento CAPES, FAPESP (2014/06923-6; 2014/17486-6 e 2016/24391-7), e CNPq (444912/2014-2) pelo investimento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Serei eternamente grata a todos vocês.

RESUMO

SILVA, I.S. **Transcriptômica da via de biossíntese dos monolignóis ao longo do desenvolvimento dos entrenós de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2019. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

As gramíneas são o mais importante grupo de plantas para em todo o mundo. Inúmeras são usadas para a alimentação dos animais, além de serem utilizadas para a produção de biocombustíveis, contribuindo para a redução do consumo de combustíveis fósseis e consequentemente da poluição ambiental. A biomassa vegetal é constituída basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Estudos na área de bioquímica e genética tem demonstrado a lignina como um dos principais compostos responsáveis pela recalcitrância da biomassa, sendo a resistência à digestão enzimática uma importante limitação do processo de produção de bioetanol. A lignina é um polímero vegetal resultantes da polimerização desidrogenativa de três monômeros de fenilpropanóides primários, os álcoois p-coumarilico (H), coniferilico (G) e sinapilico (S). A via metabólica dos fenilpropanóides envolve a participação de 11 enzimas, nas gramíneas, tais como PAL, C4H, 4CL, C3H, F5H, CCoAOMT, CSE, COMT, HCT, CCR e CAD. Até o momento, 28 genes de cana-de-açúcar foram identificados no SUCEST e explorados para identificar os possíveis *bona fide*. No entanto, com a disponibilização de bancos transcriptômicos (RNA-Seq) e ferramentas avançadas de bioinformática, o nosso grupo de pesquisa expandiu para 37 genes após o processo de identificação, anotação e classificação pelas análises filogenéticas. Diante disso, a presente proposta teve por objetivo realizar a análise de expressão destes transcritos anotados em uma variedade de cana-de-açúcar com a composição química da parede celular caracterizada. Para identificar quais genes estão envolvidos nesta via, o presente trabalho propôs correlacionar o perfil de expressão com os quatro estágios de desenvolvimento do entrenó, separando córtex e medula, os quais estão associados aos estágios de lignificação em maior e menor grau, respectivamente. Dentre as análises realizadas, 34 transcritos tiveram os *primers* padronizados , 26 foram expressos no colmo nas condições testadas, sendo 7 genes adicionais aos previamente descritos na literatura. Baseado nas análises de expressão gênica, *PAL1.1/1.2, COMT1, CAD2/5/8, 4CL2, F5H1, CCoAMOT1.2/2.1* e *CCR1* foram apontados como possíveis candidatos principais na via de biossíntese da lignina.

Palavras – chave: cana-de-açucar. lignina. monolignol.

ABSTRACT

SILVA, I.S. **Transcriptomics of the monolignol biosynthesis pathway along sugarcane internodes development (*Saccharum* spp.).** 2019. 66p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a grass of great importance for the sustainable technological and agroindustrial development of Brazil. The cell wall of the grasses is basically composed of cellulose, hemicellulose, lignin and hydroxycinnamic acids. The study of the chemical composition of the cell wall of different sugarcane hybrids revealed that low lignin content, in particular for H89 (~ 16.8%), contribute to the low recalcitrance of the biomass. These studies obtained greater information when the regions of rind and pith of H89 were dissected, which present, respectively, 21.7% and 13.9% of total lignin. Lignin is a plant polymer resulting from the dehydrogenative polymerization of three primary phenylpropanoic monomers, the p-coumaril (H), coniferyl (G) and synapylic (S) alcohols. The metabolic pathway of the phenylpropanoids involves the participation of several enzymes, totalizing in the grasses 11 sets, such as PAL, C4H, 4CL, C3H, F5H, CCoAOMT, CSE, COMT, HCT, CCR and CAD. So far, 28 unigenes of sugarcane have been identified in SUCEST and explored to identify the possible *bona fide*. Recently, based on bioinformatics, phylogenetic and transcriptomic (RNA-Seq) analyzes of sugarcane and related grasses, our research group identified 37 transcripts possibly involved in monolignol biosynthesis. In the presence of detailed descriptions of the composition of lignin in H89 and of the large number of genes identified, the present proposal aimed to perform the analysis of the expression of these transcripts annotated in H89. In order to amplify and reinforce which genes are involved in the monolignol pathway, the present work proposed to correlate the expression profile with four stages of the development of the enternode, exploring the regions of rind and pith. Among the analyzes performed, 34 genes were identified, 26 genes were expressed, being 7 additional genes to those previously described in the literature. In this context, *PAL1.1 / 1.2, COMT1, CAD2 / 5/8, 4CL2, F5H1, CCoAMOT1.2 / 2.1* and *CCR1* were identified as potential candidates in the lignin biosynthesis pathway.

Keywords: sugarcane. lignin. monolignol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular secundária 15
Figura 2 - Via dos fenilpropanóides. 21
Figura 3 - Regiões do entrenó da cana-de-açúcar. 27
Figura 4 - Curva de amplificação do gene *GAPDH* 31
Figura 5 - Curva de amplicação do gene *CSE1* 35
Figura 6 – Análise de expressão dos genes da via de biossíntese dos monolignóis em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de genes da via de biossíntese de lignina. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

PAL	fenilalanina amônia-liase
C4H	cinamato 4-hidroxilase
4CL	4-coumarato coenzima A ligase
C4H	cinamato 4-hidroxilase
C3H	4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase
F5H	ferulato 5-hidroxilase
CCoAOMT	cafeoil-CoA O-metiltransferase
COMT	ácido cafeico O-metiltransferase
CCR	cinamoil-CoA redutase
CAD	cinamoil álcool desidrogenase
HCT	p-Hidroxicinamil-CoA chiquimato transferase
CSE	cafeoil chiquimato esterase
cDNA	DNA complementar
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RT – qPCR	Quantitative reverse transcription PCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
2. REFERENCIAL TEÓRICO 12
2.1. COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL 12
2.2. LIGNINA 15
2.3. IMPORTÂNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR 17
2.4. GENÉTICA DA BIOSSÍNTESE DE LIGNINA EM GRAMÍNEAS 19
2.5. CONTEÚDO DA PAREDE CELULAR NOS HÍBRIDOS 89 (H89) 22
3. JUSTIFICATIVA 25
4. OBJETIVOS 26
4.1. OBJETIVO GERAL 26
4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 26
5. MATERIAL E MÉTODOS 27
5.1. MATERIAL VEGETAL 27
5.2. EXTRAÇÃO DE RNA 28
5.3. SÍNTESE DE CDNA 28
5.4. PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR) 29
5.5. ANALISE DE DADOS 29
6. RESULTADOS 30
6.1. PADRONIZAÇÃO DOS *PRIMERS* 30
6.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO RT-qPCR 32
7. DISCUSSÃO 38
8. CONCLUSÃO 45
REFERÊNCIAS 46
ANEXO A – CURVAS DE PADRONIZAÇÃO DOS *PRIMERS* 54
ANEXO B – SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS 60
ANEXO C – TABELA DE RESULTADO DA PADRONIZAÇÃO DOS *PRIMERS* 64

1. INTRODUÇÃO

Com a modernização das cidades e o aumento da industrialização a demanda energética passou a aumentar exponencialmente. A plataforma energética mais utilizada atualmente baseia-se no petróleo e gás natural, recursos que além de finitos (a longo prazo) trazem danos ao meu ambiente.

Nesse cenário, ao longo dos anos a procura por recursos energéticos alternativos aos combustíveis fosseis vem aumentando continuamente. Assim, a biomassa lignocelulosica apresenta-se como matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis como o bietanol de segunda geração, uma vez que espécies vegetais já utilizadas pelo homem para alimentação, a cana-de-açúcar, são ricas em fibras que possuem em sua parede celular carboidratos conversíveis em bioprodutos de alto valor agregado.

A constituição da parede celular é formada por celulose, hemicelulose e lignina. A lignina dificulta o acesso a enzimas, diminuindo considerávelmente o rendimento sacarificação dos carboidratos da parede celular, tornando necessário a aplicação de métodos químicos ou físicos que encarecem o processo de produção e o tornam mais moroso.

Desta forma, possuir menor conteúdo de lignina ou uma lignina com constituição mais favorável ao processo de sacarificação é uma característica desejável as espécies vegetais utilizadas como fonte de biomassa lignocelulósica.

Através da biotecnologia, utilizando ferramentas como a biologia molecular, plantas podem ser modificadas geneticamente para possuir características desejáveis aos processos mencionados anteriormente. O entendimento das sequências do genoma, função gênica, expressão gênica, interações de proteínas e mecanismos de controle metabólico permite a formação de uma sólida base científica que permite a aplicação dessa tecnologia. Sendo assim, uma combinação de biomassa cuidadosamente projetada com novas abordagens para o bioprocessamento pode fornecer a melhor oportunidade de criar uma plataforma sustentável para o futuro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal desempenha uma série de funções essenciais, incluindo dar forma aos vários tipos de células necessários à formação dos tecidos e órgãos da planta. Formam a interface entre células adjacentes desempenhando um papel importante na comunicação intercelular, assim como por sua localização na superfície celular possuem função importante durante a interação planta-microrganismos, incluindo respostas de defesa contra potenciais patógenos (PAULY; KEEGSTRA, 2010).

As células vegetais possuem em sua grande maioria paredes celulares com constituição similar. Elas consistem em uma fase de microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz. Esta matriz é composta principalmente de polissacarídeos (polissacarídeos não celulósicos) com uma variedade de estruturas diferentes, mas onde podem estar presentes também glicoproteínas, proteínas estruturais, e componentes fenólicos, incluindo a lignina. Diferentes grupos de plantas podem possuir composição polissacarídica da parede celular bastante diferente. Para simplificar esta complexidade, são frequentemente reconhecidos dois grandes grupos de tipos de parede: primária e secundária (ROBERT; HENRY, 2005).

A parede celular primária é depositada enquanto as células estão aumentando de tamanho, precisam ser mecanicamente estáveis e suficientemente extensíveis para permitir a expansão celular, evitando a ruptura das células sob a pressão do turgor. A parede celular secundária é depositada na parede primária depois que as células pararam de aumentar e geralmente são muito mais espessas, conferem estabilidade mecânica a tecidos especializados, como elementos vasculares (REITER, 2002). Desta forma, as células vegetais podem ser agrupadas dependendo da sua constituição na maturidade, podendo então possuir parede celular primária e secundaria. Quanta a parede celular secundária as a células vegetais ainda podem ser subgrupadas naquelas contendo lignina (paredes lignificadas), que são as mais comuns, e as que possuem paredes que não contêm lignina (paredes não lignificadas) (HARRIS; SMITH, 2006).

A parede celular primária das plantas superiores é composta predominantemente de polissacarídeos, glicoproteínas estruturais. Vinte diferentes resíduos glicosídicos estão presentes em variadas quantidades na parede celular primária. Esses resíduos glicosídicos

incluem hexoses, pentoses, desoxihexoses, resíduos glicosídicos ácidos. Nas angiospermas e gimnospermas a parede celular primária é compostas por celulose, hemicelulose (xiloglucana, glucomanana, e arabinoxilana) e pectina (homogalacturona, rhamnogalacturona, e substituintes galacturona) (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Considerando-se as proporções dos polissacarídeos formadores da pectina, as proporções e a estrutura dos polissacarídeos formadores da hemicelulose, a parede celular primária pode ser classificada em tipo I e II. O tipo I é comumente constituído por xiloglucana e/ou glucomanana e pectina (20-35%), sendo encontrada em todas as eudicotiledôneas, em algumas monocotiledôneas e em gimnospermas. O tipo II está presente em Poaceae (gramíneas), como a cana-de-açucar, monocotiledônea do clado comelinídeas, que são ricas em arabinoxilanas, e contém 10% de pectina. (O'NEILL; YORK, 2003; CARPITA, 2000).

A celulose consiste em cadeias de glucano contendo entre 500 e 14,000 ligações β-1,4 entre os resíduos glicosídicos, que interagem entre si através de pontes de hidrogênio para formar uma estrutura cristalina (SOMERVILLE et al., 2004). As microfibrilas de celulose são compostas por numerosas cadeias lineares de glucano sintetizadas em paralelo por complexos proteicos incorporados na membrana plasmática. Essas microfibrilas são organizadas de maneira a conferir importantes propriedades físicas que determinam sua interação com os componentes da matriz (COSGROVE, 2014).

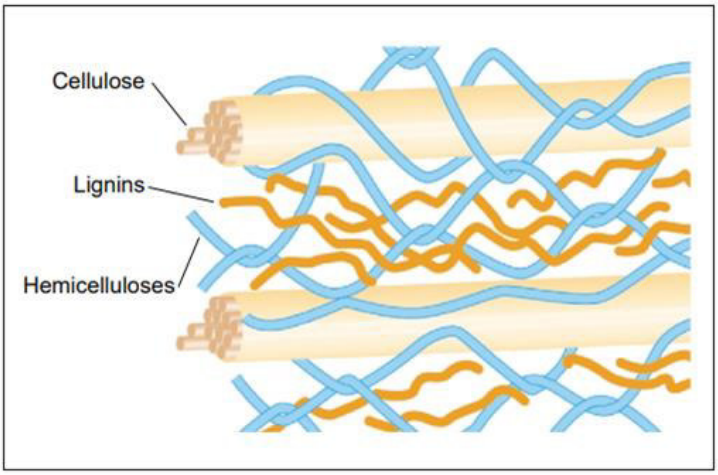
As pectinas são polissacarídeos altamente heterogêneos, tradicionalmente caracterizados por serem facilmente extraídos com ácido quente ou quelantes e por conterem uma grande quantidade de resíduos de ácido galacturónico, enquanto que as hemiceluloses são polissacarídeos que possuem estruturas β-1,4 ligados em uma configuração equatorial. As hemiceluloses incluem xiloglucanos, xilanos, mananos, glucomananos e β- 1,3 e β-1,4 glucanos. Esses tipos de hemiceluloses estão presentes nas paredes celulares de todas as plantas terrestres, com exceção de β- 1,3 e β-1,4 glucanos, que são restritos ao ordem Poales e a alguns outros grupos. A estrutura detalhada das hemiceluloses e sua abundância variam amplamente entre diferentes espécies e tipos de células. O papel biológico mais importante das hemiceluloses é a sua contribuição para o fortalecimento da parede celular pela interação com a celulose e, em algumas paredes, com a lignina (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Após a expansão celular cessar, as células continuam a sintetizar uma parede conhecida como parede celular secundária. A parede celular secundária geralmente é bastante espessa, como nas tracóides, fibras e outras células que servem como suporte mecânico da planta. Frequentemente, essas paredes secundárias são multicamadas e diferem na estrutura e composição da parede primária. Por exemplo, as paredes secundárias na madeira contêm xilanos em vez de xiloglucanos, bem como uma maior proporção de celulose. A orientação das microfibrilas de celulose pode ser alinhada mais nitidamente de forma paralela umas às outras nas paredes secundárias do que nas paredes primárias. Paredes secundárias são frequentemente (mas nem sempre) impregnadas com lignina (COSGROVE, 2014).

A parede celular secundária contêm celulose (40-80%), hemicelulose (10-40%) e lignina (5-25%). O arranjo desses componentes permite que as microfibrilas de celulose sejam incorporadas à lignina, assim como as hastes de aço são embutidas no concreto para formar o concreto protendido. Na madeira, três camadas de parede celular secundária, referidas como as lamelas S1 (mais externa), S2 e S3 (mais interna), resultam da disposição diferente das microfibrilas. Durante a formação da parede celular secundária, ocorre lignificação nas lamelas S1 e S2, bem como na parede primária e na lamela média. A lignificação raramente ocorre na lamela S3. A celulose e a hemicelulose parecem ser organizadas mais estruturalmente na parede celular secundária do que na parede celular primária (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992).

A parede celular secundária fornece um excelente exemplo de como a modificação da parede celular confere propriedades específicas a uma célula para permitir que essa cumpra funções especializadas. A parede celular secundária está frequentemente presente nas células que fornecem suporte para o corpo da planta e em células envolvidas no transporte de água e solutos das raízes para os tecidos aéreos. A parede celular secundária permite que essas células resistam às forças da gravidade e/ou as forças tensionais associadas à tração em uma coluna de água (CARPITA; TIERNEY; CAMPBELL, 2001).

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular secundária. Constituintes menos abundantes não foram representados.



Fonte: (BOUDET et al., 2003)

2.2. LIGNINA

A lignina é uma das mais importantes biomoléculas que compõe a parede celular das plantas vasculares, conferindo suporte estrutural, transporte de agua, entre outras funções. A lignina liga-se a hemicelulose para formar uma estrutura semelhante a uma malha, proporcionando resistência mecânica necessária para a estatura vertical e a hibrofobicidade necessária a parede celular dos tecidos vasculares. (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; YUAN et al., 2008; XU et al., 2009).

A lignina é, após a celulose, o segundo biopolímero terrestre mais abundante, representando cerca de 30% do carbono orgânico na biosfera. Acredita-se que o surgimento da lignina durante a evolução foi crucial para a adaptação evolutiva das plantas de um meio aquático ao terrestre. Estas novas macromoléculas desempenharam um papel crucial em conferir a este compartimento celular novas propriedades essenciais para a adaptação das plantas às suas novas condições ambientais (BOUDET, 2000). A lignina é depositada principalmente na parede secundária de tecidos envolvidos na condução e suporte, é crucial para a integridade estrutural da parede celular, rigidez e força do caule. Além disso, a lignina está envolvida em uma variedade de funções biológicas, incluindo defesa de plantas e resistência a estresse abiótico (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

A síntese de lignina resulta de uma longa cadeia de reações sequencias que representa um dos processos biossintéticos mais caros em plantas quanto à demanda energética (BOUDET, 2000). A lignina é tradicionalmente descrita como polímeros vegetais compostos por três monômeros primários com várias ligações típicas (DAI; PATTI; SAITO, 2016), resultantes da polimerização desidrogenativa (através de reações de acoplamento radical) de três monómeros de fenilpropanóides primários, álcool p-coumarilico (4-hidroxi-cinamilo), álcool coniferilico (4-hidroxi-3-metoxi-cinamilo) e álcool sinapilico (3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinamil), álcoois análogos que variam em seus graus de metoxilação. Eles representam uma classe de produtos naturais poliméricos complexos presentes em grandes quantidades nas paredes celulares de plantas terrestres (RALPH et al., 2001).

O teor e composição de lignina são conhecidos por variar entre espécies diferentes, tecidos e tipos de células dentro de um mesmo tecido, bem como correlaciona-se com os estados de desenvolvimento e as condições ambientais. A estrutura molecular varia principalmente nas proporções relativas de suas unidades monoméricas e no tipo de ligações intermonômeras. Essas diferenças podem ser explicadas pelas especificidades do substrato e pela regulação espaço temporal de certas enzimas na via biossintética da lignina (BAUCHER et al., 1998).

Dada a sua abundância e importância nas plantas vasculares, a lignina é um dos componentes-chave da matéria-prima e biomassa vegetal. A lignina fornece biomassa de alta densidade energética para pirólise e combustão direta, e é também uma fonte importante de compostos aromáticos. A natureza recalcitrante da lignina, no entanto, oferece grandes desafios para a sua aplicação como matéria prima para biocombustível (MAEDA, 2016), assim esses biopolímeros atraíram uma atenção significativa à pesquisa, pois representam um grande obstáculo à polpação química, à digestibilidade da forragem e ao processamento de biomassa vegetal para biocombustíveis. Essas indústrias se beneficiariam do processamento da biomassa com menos lignina ou uma lignina mais fácil de degradar (VANHOLME et al., 2008).

A lignina é o principal composto responsável pela recalcitrância da biomassa, sendo a resistência à digestão enzimática uma importante limitação do processo de produção de bioetanol, uma vez que a eficiência da bioconversão depende, dentre outras coisas, da arquitetura da parede celular e da distribuição espacial da lignina, pois estas afetarão a

migração local de enzimas através de poros da parede celular até a celulose, xilanos e outros glucanos (CHEN; DIXON, 2007; MCCANN; CARPITA, 2008; EUDES et al., 2014). Assim, antes da hidrólise enzimática, a biomassa deve ser pré-tratada para remover a lignina para tornar a celulose mais suscetível à sacarificação e gerar altos rendimentos de açúcares fermentáveis. A utilização de altos teores de acidez ou energia termica reduz a eficiência do processo de sacarificação e fermentação no estagio posterior da produção. O alto custo incorrido durante o processamento é o principal fator limitante na produção de biocombustível celulósico e faz com que o preço do etanol celulósico seja duas a três vezes maior do que o etanol à base de amido (KASIRAJAN et al., 2017).

O crescente interesse na lignificação resultou da identificação progressiva deste processo essencial como uma via transversal em muitos aspectos importantes da biologia vegetal: evolução bioquímica, partição de carbono, diferenciação celular, adaptação funcional à condução de água e estresse abiótico e biótico. A especificidade estrutural e química das paredes secundárias lignificadas resulta da expressão coordenada de numerosos genes envolvidos na biossíntese, montagem e deposição de um molde de parede de polissacarídeo adaptado e depois do próprio polímero de lignina (BOUDET et al., 2003).

2.3. IMPORTÂNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR

As gramíneas, que incluem os cereais comuns, representam indiscutivelmente o mais importante grupo de plantas para as sociedades humanas em todo o mundo. Alimentos preparados a partir de arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cevada (*Hordeum vulgare*), e cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) representam uma grande quantidade das calorias diárias da alimentação humana e de outros animais (BURTON et al., 2006), por isso a composição da sua parede celular é fundamental a sua utilização na alimentação animal e ao seu uso para produção de combustíveis. As paredes celulares das gramíneas diferem drasticamente das paredes das eudicotiledôneas em termos dos principais polissacarídeos estruturais presentes, como esses polissacarídeos estão ligados, abundância e importância das pectinas, proteínas e compostos fenólicos (VOGEL, 2008). Assim possuem parede celular tipo II, em oposição à parede celular tipo I presente em todas as monocotiledôneas e não-gramíneas (CARPITA, 1996).

A demanda energética aumenta continuamente devido ao rápido desenvolvimento populacional e industrial, ao passo que o desenvolvimento de fontes de energia não acompanha o aumento do consumo. A principal fonte de energia para suprir essa demanda provém do petróleo e do gás natural, que são fontes de energia não renováveis, assim, há uma grande necessidade de recursos energéticos alternativos que sejam baratos, renováveis e não causem poluição. A produção de biocombustíveis a partir da biomassa apresenta-se como solução a essa questão contribuindo para a redução do consumo de combustíveis fósseis e consequentemente da poluição ambiental (BALAT;BALAT;ÖZ, 2008; SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009)

Gramíneas, como a cana-de-açúcar, vem sendo modificadas geneticamente visando o melhoramento de características, tais como o aumento de açúcares fermentáveis, e a diminuição de fibras residuais, que favorecem a conversão da matéria-prima lignocelulósica em bioprodutos como o bioetanol, biodisel e outros compostos intermediários que substituem os atualmente utilizados a base de petróleo (MCLAREN, 2005).

O bioetanol pode ser produzido a partir de matérias-primas contendo açúcares fermentáveis como a cana-de-açúcar, beterraba e resíduos agroindustriais que sejam ricos em sacarose. Além disso, o bioetanol também pode ser produzido a partir de alguns polissacarídeos que podem ser hidrolisados para a obtenção de açúcares conversíveis em álcool etílico. A biomassa lignocelulósica (um complexo composto por vários polissacarídeos e compostos fenólicos) é a matéria-prima promissora, considerando sua grande disponibilidade e baixo custo (WYMAN, 1999; SANCHEZ, 2008; CARDONA, 2017).

A cana-de-açúcar é única entre as gramíneas por possuir a capacidade de acumular sacarose em concentrações muito altas. Ao fazê-lo, é provável que vários processos, alguns provavelmente não ligados ao metabolismo da sacarose diretamente, sejam ativados para manter a integridade e a homeostase celular, bem como fornecer suporte físico durante este processo (CASU et al., 2007).

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada em países tropicais como Brasil e Índia por ser uma fonte rica em matéria orgânica lignocelulósica, além de possuir a natureza perene. A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* que abrange duas espécies selvagens *S. officinarum, S. robustum* e *S. spontaneum* e quatro grupos de

híbridos cultivados denominados:*S. barberi, S. sinense* e *S. edule*. A espécie produtora de açúcar, *S. officinarum,* originou-se a partir da espécie selvagem *S. robustum,* enquanto, *S. barberi* e *S. sinense* demonstraram ser híbridos naturais entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. A origem de *S. edule* ainda não está clara (HONT; PAULET; GLASZMANN, 2002; GIRALDO et al., 2008; PIPERIDIS; D'HONT, 2010; MENDES et al., 2016). As cultivares modernas substituíram progressivamente as cultivares tradicionais durante o século XX. A maioria dos primeiros foi produzida por cruzamentos artificiais entre cultivares tradicionais e clones de *S. spontaneum*, seguidos de várias gerações de seleção clonal (GRIVET et al., 2004).

2.4. GENÉTICA DA BIOSSÍNTESE DE LIGNINA EM GRAMÍNEAS

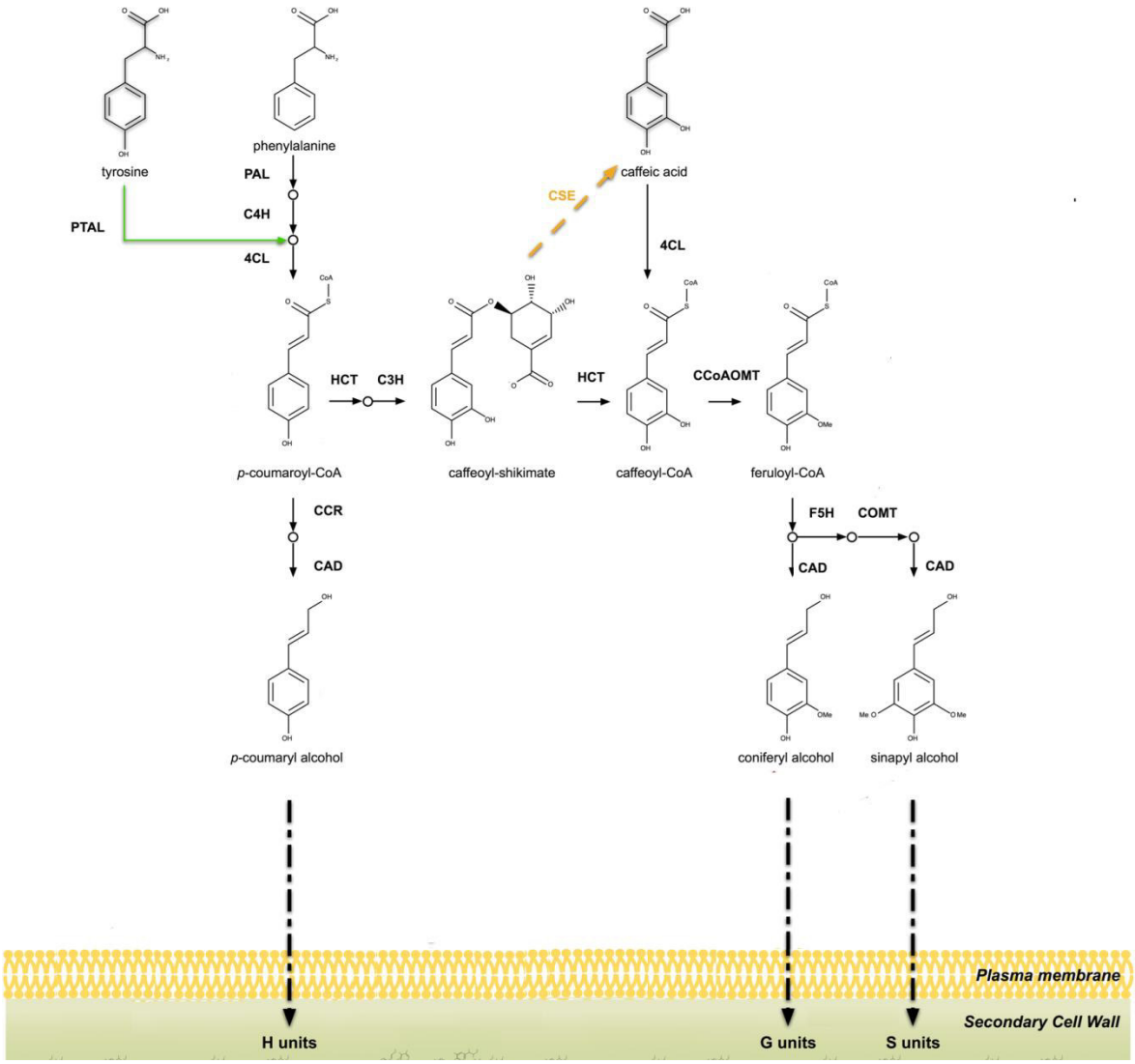
Os metabólitos secundários, especialmente a via dos fenilpropanóides, desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa da planta via efeitos tóxicos diretos e a deposição ativa e rápida de barreiras, como a lignina(BALLESTER; LAFUENTE; GONZÁLEZ-CANDELAS, 2006). Fenilpropanóides são produtos naturais derivados do aminoácido L-fenilalanina. Os exemplos mais simples, contendo apenas o esqueleto C_6C_3 fenilpropano, são os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido sinápico, e os monolignóis, como o álcool coniferílico. A síntese dos monolignóis a partir da fenilalanina requer desaminação, hidroxilação em uma, duas ou três posições do anel aromático, metilação de um ou dois destes grupos hidroxila, e duas reduções sucessivas da cadeia lateral do monolignol a partir do primeiro ácido carboxílico a um aldeído e depois a um álcool. A via principal dos fenilpropanóides (Figura 2) envolve reações da fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-coumarato coenzima A ligase (4CL) e as vias de derivação específicas para a formação de monolignols / lignina, cumarinas, ácidos benzóicos, stilbenos e flavonóides / isoflavonóides. Em muitas plantas, algumas ou todas essas enzimas são encontradas como múltiplas isoformas codificadas por diferentes genes, variando em suas propriedades cinéticas e sua distribuição em toda a planta, totalizando 10 famílias genicas que codificam as enzimas que controlam a biossíntese de lignina (DIXON et al., 2002; BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

Em cana-de-açúcar, foram identificados 28 genes entre os quais se encontram quatro *PALs*, dois *C4Hs*, três *4CLs*, um *HCT*, um *HCT*-like, dois *C3Hs*, três *CCoAOMTs*, dois *CCRs*, um *COMT*, um *F5H* e quatro *CADs* (BOTTCHER et al., 2013).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) é a primeira enzima da via, geral dos fenilpropanóides. Catalisa a desaminação da fenilalanina a amônia e acido trans-cinamico a partir do qual os compostos fenólicos são produzidos nos vegetais superiores (KOUKOL;CONN.,1961). Sendo a principal enzima da via pode regular o fluxo dos metabólitos primários para o metabolismo secundário (DENG et al., 2015). Vários fenilpropanóides simples são produzidos a partir do cinamato através de uma série de reações de hidroxilação, metilação e desidratação. Os ácidos livres raramente se acumulam em níveis elevados dentro das células vegetais; em vez disso, eles são geralmente conjugados com açúcares, carboidratos da parede celular, ou ácidos orgânicos formando diversos compostos do metabolismo secundário vegetal como flavonóides, antocianinas e lignina (DIXON, 1995).

Em monocotiledôneas, PAL também é capaz de utilizar tirosina como substrato para a via fenilpropanóide (atividade TAL), enquanto em eudicotiledôneas são capazes de utilizar apenas fenilalanina eficientemente (ROSLER, 1997). A atividade TAL em gramíneas fornece uma via alternativa para a formação de ácido 4-coumarico sem a hidroxilação do ácido trans-cinamico pela monooxigenase cinamato 4-hidrixilase (C4H). Em experimentos com *Brachypodium distachyon*, Dixon et al. 2016, identificaram que a tirosina (L-Tyr) é quase tão eficientemente incorporada a lignina quanto à fenilalanina (L-Phe), porém (L-Tyr) é preferencialmente incorporada as subunidade S da lignina, indicando que a atividade TAL/PTAL contribui significativamente para características específicas da parede celular em gramíneas, uma vez que os efeitos da relação PAL/TAL na relação S/G da lignina podem teoricamente refletir na cinética do ponto de ramificação entre síntese de lignina G e S. Na maioria das plantas, PAL é codificada por uma família multigênica que contém de 2-6 membros (LOGEMANN; PARNISKE; HAHLBROCK, 1995).

Figura 2 - Via dos fenilpropanóides. Fenilalanina amônia liase (PAL), Cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) e ferulato 5-hidroxilase (F5H), cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), ácido cafeico O-metiltransferase (COMT), cinamoil-CoA redutase (CCR), cinamoil álcool desidrogenase (CAD), 4-Hidroxicinamoil CoA ligase (4CL), p-Hidroxicinamil-CoA chiquimato transferase (HCT) e cafeoil chiquimato esterase (CSE).



Fonte: (Adaptado de Cesarino et al. 2016).

Além da reação mediada pela PAL, três diferentes monoxigenases dependentes de citocromo P450: cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) e ferulato 5-hidroxilase (F5H), enzimas hidrolases dependente de monooxidases pertencentes ao citocromo P450 (CPR) (BAK et al., 2011), duas metiltransferases, cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), ácido cafeico O-metiltransferase (COMT) e duas oxirredutases, cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamoil álcool desidrogenase (CAD) (KIEDROWSKI et al., 1992) atuam na via. Além dessas oito enzimas cujas ações são aparentes nos produtos finais da via, mais duas enzimas, 4-Hidroxicinamoil CoA ligase (4CL) e p-Hidroxicinamil-CoA chiquimato transferase (HCT), são necessárias para sintetizar intermediários que servem como substratos para reações subseqüentes. 4CL é

uma ligase CoA dependente de ATP que catalisa a síntese de p-coumaroil CoA. Este p-coumaroil CoA é então usado como um doador acila pela enzima HCT, pertencente a família de BAHD aciltransferase, para sintetizar p-coumaroil shiquimato, o substrato para 3-hidroxilação por C3H (WHETTEN; SEDEROFF, 1995; BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

Alternativamente, o p-coumaroil CoA pode ser utilizado como substrato para a chalcona sintase, desviando-a para a via dos flavonóides, ou CCR, comprometendo-a com a biossíntese da lignina-H. A via relativamente menor que leva ao álcool p-coumaroilico (lignina H) requer apenas um subconjunto dessas enzimas (PAL, C4H, 4CL, CCR e CAD), enquanto a síntese de álcool coniferílico (lignina G) requer esses cinco mais HCT, C3H e CCoAOMT e a síntese de álcool sinapílico (lignina S) requer todas as dez enzimas, incluindo F5H e COMT (LEE et al., 1998; RAES, 2003; ACHNINE et al., 2004)

A Cafeoil shiquimato esterase (CSE) uma enzima central para a via biossintética da lignina, foi recentemente identificada e mostrou catalisar a conversão de Cafeoil shiquimato em cafeato em Arabidopsis, através de sua atividade combinada com a de (4CL) produz cafeoil-CoA, contornando a segunda reação de HCT (VANHOLME et al., 2013; VARGAS et al., 2016).

2.5. CONTEÚDO DA PAREDE CELULAR NOS HÍBRIDOS 89 (H89)

A organização anatômica da cana-de-açúcar é composta principalmente por feixes vasculares e células do parênquima. No entrenó a parte mais externa é chamada de córtex e a região mais interna é geralmente chamada de medula. O córtex contém grande quantidade de feixes vasculares rodeados por grande número de fibras e pouca quantidade de células parenquimáticas. Por outro lado, a medula é rica em células do parênquima que armazenam sacarose e possui menor número feixes vasculares (MOORE et al., 1987).

O híbrido de cana-de-açúcar selecionado como objeto de estudo desse trabalho possui características contrastantes quanto à composição da parede celular e consequentemente quanto a características morfológicas quando comparados aos outros híbridos de cana-de-açúcar cultivados sobre as mesmas condições e no mesmo período. Quanto ao conteúdo de lignina, o H140 possui 21,5%, enquanto que o H89 apresenta 16,8%. No geral, os teores de lignina demonstraram aumentar da medula em direção ao

córtex**.** Quanto à morfologia, cortes transversais de cada região do entrenó mostraram que na medula há predominância de células parenquimáticas, enquanto que no córtex há a predominância de fibras e feixes vasculares. O aumento na frequência de feixes vasculares da medula para o córtex se correlaciona com o aumento da recalcitrância das mesmas frações, pois os vasos e fibras nos feixes vasculares são pouco digeridos em comparação com o parênquima na medula, que é prontamente hidrolisada. O H89 possui menos fibras e feixes vasculares quando comparado ao H140, assim como a medula de ambos os híbridos, possuem mais tecido parenquimático quando comparado ao córtex, corroborando com esse fato os níveis mais altos de hidrólise da celulose foram encontrados no híbrido com menor teor de lignina (H89) (COSTA et al., 2013).

A lignina é considerada um dos principais fatores que dificultam a hidrólise de materiais lignocelulósicos estando ligada à fração de carboidratos através da esterificação de resíduos de ácido hidroxicinâmicos, como ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, a lignina forma potencialmente uma barreira física às enzimas, diminuindo a taxa de conversão de biomassa (VÁRNAI et al., 2014). Quando testado quanto á digestibilidade enzimática o H140, em estudo anterior, apresentou a menor taxa de conversão de celulose após 72h de tratamento enzimático, enquanto que H89 produziu o mais alto nível de conversão. Os dados de digestibilidade mostraram que a hidrólise enzimática da celulose aumentou em híbridos com menor teor de lignina havendo quase uma correlação linear entre os níveis de conversão de celulose após hidrólise enzimática e o teor de lignina dessas amostras (MASARIN et al., 2011).

Regiões mais internas, ricas em parênquima, menos lignificadas, são menos recalcitrantes, especialmente em plantas com baixo teor de lignina (MENDES et al., 2016). Em outro estudo, as amostras de medula sem tratamento para remoção de lignina mostraram ser prontamente hidrolisadas por celulases, indicando que as células do parênquima menos lignificadas, que ocorrem principalmente na região medular, são significativamente menos recalcitrantes do que as fibras e tecido vascular predominantes na região do córtex. A conversão de celulose não mostrou aumento quando tratamento para remoção de lignina é aplicado a medula, enquanto no córtex há aumento significativo da conversão da celulose pelas celulases quando a lignina é removida significativamente (SIQUEIRA et al., 2011). As regiões da medula geralmente são ricas em glucano e possuem baixo teor de lignina. As frações do córtex, por outro lado, apresentaram maiores teores de lignina e proporcionalmente menos glucano (COSTA et al., 2016).

Quanto à composição da lignina foi demonstrado que esta também varia radialmente dentro do entrenó, sendo diferencialmente regulada entre as duas regiões anatomicamente distintas, medula e córtex. Um estudo realizado em 2013 mostrou que no córtex da cana-de-açúcar das amostras analisadas houve um decréscimo acentuado na relação S-G nos tecidos intermediários e maduros em comparação com os tecidos jovens, causada por um aumento no conteúdo da unidade G. Por outro lado, a relação S-G nas regiões de medula aumentou durante a maturação do caule, uma vez que houve aumento da subunidade S nas regiões medular dos entrenós intermediários e maduros provavelmente devido à lignificação das células do parênquima, que são mais numerosas do que os feixes vasculares, sendo assim a diferença entre essas duas regiões anatômicas se torna mais evidente com a maturidade do colmo (MARCHESINI, 2013). Em conjunto, esses dados confirmaram que o córtex do entrenó da cana-de-açúcar é mais recalcitrante que a medula e, que provavelmente a alta resistência à desestruturação das paredes celulares está associada à maior lignificação do córtex devido à abundância de vasos do xilema e fibras (SANTOS, 2014). Assim, o teor e composição de lignina, bem como o padrão de expressão gênica, variaram com genótipo, tipo de tecido e posição no caule (SANTOS BRITO et al., 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em consideração o papel da lignina na recalcitrância da parede celular vegetal, a produção de plantas com menor ou maior conteúdo de lignina é de grande interesse, uma vez que por ligar-se fortemente aos açúcares da parede celular a lignina dificulta a ação de enzimas durante o processo de sacarificação. Por outro lado, a maior quantidade de lignina favorece o processo de obtenção de bioenergia pelas indústrias. Dessa forma, alterações quantidade e na composição dos monolignóis produzem reatividade e mudanças de propriedade que podem ser benéficas para muitos processos. Portanto, um dos principais objetivos das pesquisas com plantas utilizadas como fonte de biomassa, como a cana-de-açúcar, é tornar as paredes celulares mais abertas e acessíveis à degradação enzimática (CHEN; DIXON, 2007; RALPH et al., 2008; PAULY; KEEGSTRA, 2010).

A compreensão da base molecular da formação dos monolignóis fornece suporte para melhorar a digestão da parede celular de espécies economicamente importantes, como a cana-de-açúcar, através da manipulação genética de vias metabólicas, como a via de biossíntese dos monolignóis. Até o momento, dentre os estudos que exploraram a análise funcional dos genes da via de biossíntese dos monolignóis, Bottcher et al., 2013, identificou um total de 28 genes e possíveis candidados envolvidos na lignificação durante a maturação do colmo de cana-de-açúcar. Porém, este estudo foi realizado apenas com a disponibilização dos transcritos do SUCEST. Diante dos novos cenários da genômica, diversos RNA-Seq de cana-de-açúcar vem disponibilizando um grande número de transcritos em diferentes órgãos e tecidos desta espécie. Com o intuito de ampliar esta abordagem e conduzir uma identificação e anotação completa dos genes da via de biossíntese dos monolignóis, o nosso grupo de pesquisa (PGEMBL), fez a identificação, anotação e classificação de 37 transcritos de cana-de-açúcar através da abordagem de bioinformática em larga-escala e análises filogenéticas. Desta forma, o grande número de genes sugere a necessidade de investigar e reforçar quais são os possíveis candidados relacionados a biossíntese dos monolignóis, ampliando as futuras aplicações agro-bioenergética e biotecnológicas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

A presente proposta tem por objetivo analisar o perfil de expressão dos genes da via de biossíntese de lignina (monolignóis) em um híbrido de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina.

4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

a) Análise e validação do funcionamento dos *primers* dos genes em estudo.

b) Análise do perfil de expressão no híbrido de cana-de-açúcar (H89) com baixo conteúdo de lignina.

c) Confirmar a participação de genes previamente descritos

d) Identificar novos genes presentes na via de biossíntese dos monolignois

e) Identificar genes promissores da via de biossíntese para manipulação genética na via de biossíntese dos monolignois.

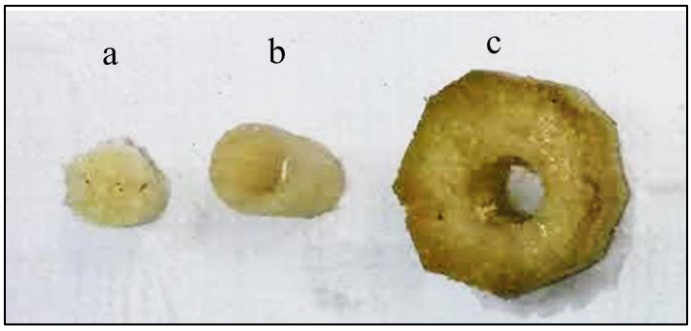
5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL VEGETAL

O plantio de 11 híbridos e três cultivares de referência de cana-de-açúcar (MASARIN *et al*, 2011) ocorreu em 2016 em campo experimental em Lorena-SP. Um dos híbridos plantados, denominado de H89, após o período de 12 meses de crescimento foi selecionado para o estudo de expressão gênica por possuir conteúdo relativamente baixo (16,8%) de lignina (MASARIN *et al*., 2011, COSTA *et al*., 2013). Amostras biológicas de entrenós em fases distintas do desenvolvimento, tais como, entrenó 1, 3, 5, e 9 (numerados do topo à base do colmo) foram coletados e separados nas regiões medula e córtex (Figura 3).

Todas as etapas seguintes foram executadas no laboratório *Plant Genomics and Bioenergy Laboratory* (PGEMBL) na Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Os reagentes para os experimentos foram financiados pelo projeto temático (2014/06923-6), auxílio regular (2014/17486-6) e universal CNPq (444912/2014-2).

Figura 3 - Regiões do entrenó da cana-de-açúcar. Na figura: (a) representa medula, (b) representa interface e (c) representa córtex.



Fonte: Autoria própria

5.2. EXTRAÇÃO DE RNA

Os tecidos do córtex e medula em diferentes fases do desenvolvimento (entrenós 1, 3, 5 e 9) foram retirados do *Ultrafreezer* e mergulhados imediatamente em nitrogênio líquido para posterior maceração em moinho criogênico modelo 2010 Geno/Grinder® (*Spex SamplePrep*®) até obter cerca de 300 mg de amostras em pó. Todas as amostras foram novamente armazenadas em Ultrafreezer modelo U410 (*New Brunswick/Eppendorf*) até o momento de extração do RNA.

A extração de RNA total foi realizada utilizando as amostras em pó produzidas na etapa anterior e o reagente *Concert™ Plant RNA Purification Reagent* (Invitrogen) seguindo recomendações do fabricante. O RNA extraído foi, então, quantificado através do espectrofotômetro BioDrop Duo (Biochrom). A qualidade e a integridade do RNA foi avaliada por meio de eletrofose em gel de agarose 0,8% em TAE 0,5, assim como pelas relações 260 nm/280 nm A e 260 nm/230 nm A fornecidas durante a quantificação pelo BioDrop.

5.3. SÍNTESE DE CDNA

Para a síntese de cDNA 1 µg de cada uma das amostras de RNA foi tratada com *RQ1 RNAse-free DNAse*® (Promega Co.), seguindo recomendações do fabricante, porém estendendo o tempo de tratamento para 45 minutos, ao invés de 30 minutos. A síntese de cDNA foi conduzida usando a enzima *SSIII* (*SuperScript III Reverse Transcriptase*® (Invitrogen™), 5 µl da solução de RNA tratada com DNAse, *FS buffer*, dNTPs e iniciador *oligodT,* seguindo manual do fabricante.

Para avaliar a eficácia da reação de DNAse, por conseguinte foi realizada RT-qPCR (*Reverse transcription quantitative PCR*) utilizando 2,5 µl das amostras de RNA tratadas apenas com DNAse, isto é, aquelas amostras que não foram utilizadas para a síntese de cDNA pela transcriptase reversa *SSIII* e 2,5µl das amostras de cDNA recém sintetizadas. O resultado foi avaliado por comparação com a curva de amplificação (*melt*) gerada a partir da reação de RT-qPCR usando o gene constitutivo *GAPDH*.

As amostras de cDNA que possuíam a qualidade necessária aos testes posteriores foram então armazenadas em freezer à -20°C no Laboratório PGEMBL.

5.4. PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Para análise da expressão gênica dos genes de interesse foram desenhados *primers* utilizando o *software primer 3 plus*, obedecendo aos parâmetros: Tamanho do fragmento entre 80 pb e 150 pb, tamanho dos *primers* entre 20 pb e 22 pb, temperatura de anelamento (Tm) entre 57°C e 63°C e conteúdo de GC entre 45% e 55%. Os *primers* foram desenhados preferencialmente na região entre o último exon e a região 3'UTR, identificada a partir de alinhamentos entre as sequências de cana-de-açúcar e o ortólogo em sorgo. A síntese foi encomendada a empresa EXXTEND (ANEXO B).

Para avaliar o funcionamento dos *primers* e para que a maior eficiência da reação de PCR fosse alcançada, inicialmente foram realizados testes de padronização por RT-qPCR para os genes selecionados. Os testes de padronização consistiram na realização de RT-qPCR utilizando um conjunto (*pool*) de amostras (córtex 1, 3, 5, 9, medula 1, 3, 5, 9 e folha jovem). As amostras foram testadas nas diluições 1:25 e 1:50, enquanto os *primers* foram testados na concentração 200, 400 e 600 mM. Os *primers* que não apresentaram resultados positivos em nenhuma das condições testadas, foram redesenhados e passaram por nova avaliação.

As reações de RT-qPCR foram conduzidas em 20 µL de reação contendo 2,5 µL de cDNA sintetizado a partir dos entrenós previamente coletados e processados, *primers reverse* (PR) e *primers forward* (PF), e o kit *SYBR Select Master Mix* (LifeTechnologies™), seguindo protocolo modificado. A RT-qPCR foi realizada no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* utilizando o seguinte programa para a maioria dos genes: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s/60°C por 30 s/72°C por 30s, com exceção do gene *CAD2* onde os testes foram realizados utilizando o seguinte programa 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s/62°C por 30 s/72°C por 30s. As análises foram conduzidas em triplicata técnica e duplicata biológica.

5.5. ANALISE DE DADOS

As análises de dados referentes a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foram realizadas através do software *ThermoCloud®* (*ThemoFisher Scientific*), por comparação entre o gene de interesse e o gene de referência utilizando a formula – ΔCt, onde $\Delta Ct = (Ct_{tag} - Ct_{ref})$, Ct = *threshold cycle*, tag = *tag gene*, and ref = *reference gene*.

Esse método foi derivado do método (LIVAK *et al.*, 2001; HELLEMANS *et al.*, 2007; SCHMITTGEN *et al.*, 2008) e o gene de expressão constitutiva *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) como normalizador (PAPINI-TERZI *et al.*, 2009; BOTTCHER *et al.*, 2013; LING *et al.*, 2014). O *heatmap* foi construído com Linguagem R, através do *software RStudio*.

A analise de variação de dois fatores e o Bonferroni *post test* foi realizado no *GraphPad Prism*® considerando como significativo p-value> 0,05. Os gráficos foram construídos no *Microsoft Excel*®.

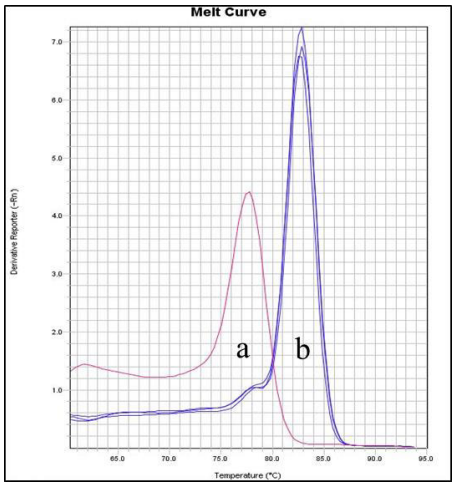
6. RESULTADOS

6.1. PADRONIZAÇÃO DOS *PRIMERS*

Através das análises de bioinformática e filogenéticas desenvolvidas anteriormente pelo nosso grupo, identificou-se 38 genes *bonafide* de cana-de-açúcar possivelmente envolvidos na via de biossíntese de lignina, usando o conjunto de bancos transcriptômicos (SUCEST, RNA-Seq de entrenó, RNA-Seq de folha, RNA-Seq de raiz e RNA-Seq de plântula). Baseado nessas analises filogenéticas foram desenhados *primers* para analise de expressão gênica em cana-de-açúcar (FERRAZ, 2016).

Para a padronização dos *primers*, inicialmente verificou-se a qualidade dos transcritos de RNAm, usando como controle o gene constitutivo *GAPDH,* em amostras de RNA tratadas com DNAse, seguido da ausência ou presença da enzima transcriptase reversa para a síntese de cDNA. Este cDNA continha a mistura do conjunto de amostras do entrenó 1, 3 e 5 (córtex e medula) e folha jovem do híbrido H89. Este teste permitiu verificar, se havia a presença de DNA genômico nas amostras de cDNA (Figura 4). Por conseguinte, foram encomendados pares de *primers*, consistindo em *forward* (PF) e *reverse* (PR).

Figura 4 - Curva de amplificação do gene *GAPDH* nas amostras de entrenó 1, 3 e 5 (córtex e medula) e folha jovem do híbrido 89 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). (a) – Curva de amplificação com pico único e definido em amostra de RNA na ausência da transcriptase reversa, sendo considerada a amostra controle negativo e (b) – curva de amplificação com picos definidos em amostras de RNA na presença da transcriptase reversa, sendo considerada a amostra controle positivo. Todas as amostras foram diluídas em 1/50.



Fonte: Autoria própria.

Para a maioria dos genes, das 38 sequencias candidatas a genes possivelmente envolvidos na biossíntese de lignina, foi desenhada inicialmente apenas um conjunto de *primers* para cada gene candidato. Com exceção de 12 genes (*PAL2*, *CAD2*, *CAD8*, *CCR1*, *HCT1-L*, *CCoAOMT1.2*, *CCoAOMT2.2*, *CCoAOMT3*, *C4H2*, *F5H2*, *CSE2*, *CSE1* (ANEXO C), a amplificação no conjunto de amostras foi obtida no primeiro ensaio experimental. Para os demais, foram desenhados outros conjuntos de *primers* até que alcançar o padrão necessário para as reações de RT-qPCR com as amostras de cana-de-açúcar do híbrido 89.

A concentração de primer determinada experimentalmente como ideal para obtenção da maior eficiência da RT-qPCR foi de 200 mM para os genes *PAL1.1, PAL1.2, 4CL1, 4CL3, 4CL5, CAD5, CAD8, CAD1, CCR2, CCR3, HCT1, HCT2, HCT-L1, COMT1, CCoAMT1.1, C3H1, C3H2, C4H1, C4H3, F5H1*. Para *PAL2, 4CL2, 4CL4, CAD7, CCR1, COMT2, CCoAMT1.2, C4H2*, e para o gene *CSE1* a concentração ideal determinada foi de 400 mM.

Já para os genes *CAD2*, *CAD6*, *CCoAMOT2.1*, *CCoAMOT2.3* e *F5H2* a concentração ideal do *primer* foi determinada em 600 mM. Quanto a diluição das amostras todos os genes obtiveram resultado positivo com *pool* de amostra em diluição 1:50, com exceção dos genes *CAD2*, *CAD6*, *CCoAMT2.1* e *F5H2* que apresentaram curvas de amplificação apenas nas amostras com diluição 1:25.

O gene *CAD2* obteve um padrão de amplificação muito variável quando testado em amostras a 60°C, então foi testado a 62°C e o padrão obtido foi correspondente ao padrão aceitável.

Para os genes *CCoAOMT2.2*, *CCoAOMT3* e *CSE2* não foi possível padronizar pois não obtiveram curvas de amplificação em nenhum desenho de *primer* testado, em nenhuma concentração de *primer* e em nenhuma diluição de amostra. Todos os *primers* obtiveram resultados positivos nos testes de padronização utilizando a temperatura de 62°C na etapa de desnaturação. Estes genes obtiveram curvas de amplificação com temperaturas entre 75°C e 90°C e picos entre 2.0 e 7.0.

Os genes *F5H2* e *CCoAMOT2.3* não apresentaram curvas de amplificação comparáveis com aquelas encontradas na padronização dos *primers* quando testados em amostras, nem mesmo quando foram testados a 62°C ou em amostras de folha.

6.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO RT-qPCR

Todos os 38 genes foram analisados, por RT-qPCR, nas amostras individuais de córtex e medula do híbrido H89 de cana-de-açúcar. Utilizando os resultados gerados a partir destas análises, foi então calculado para cada gene valores de – ΔCt a partir do qual gerou-se um gráfico por agrupamento conhecido como *heatmap* (mapa de calor) (Figura 5) contendo os dados de expressão relativa dos genes estudados. Os genes foram agrupados em quatro diferentes grupos.

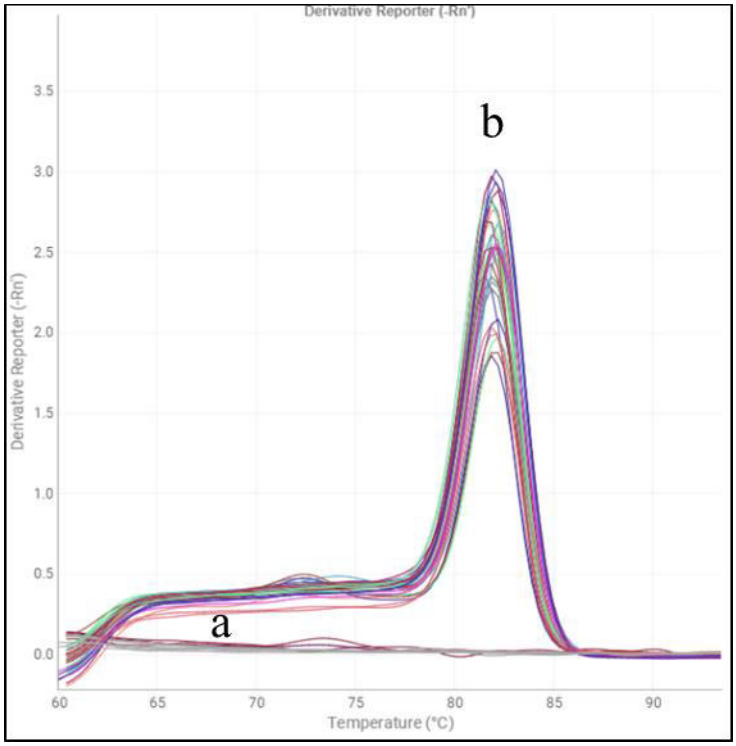
O grupamento 1 (G1) reúne os genes mais expressos dentre os estudados: *PAL1.1, CcoAOMT1.2, CCR1, PAL1.2, CcoAOMT2.1, CAD2, COMT1, C4H2, PAL2, 4CL2, CAD5, HCT2, F5H1* e *CAD8*. Todos os genes desse grupo evidenciaram diferenças de expressão entre córtex e medula.

O grupamento 2 (G2) reúne os genes menos expressos em relação ao grupo G1. Possui alguns genes envolvidos com as primeiras etapas das reações da via dos fenilpropanóides *C3H2, HCTL1, 4CL4, CCR2, C4H1, HCT1, C3H1, CCoAOMT1.1*. Dentre estes, *4CL4* e *C3H2* não foram expressos apenas no entrenó 1.

O grupamento 3 (G3) contém os genes *CAD7, CAD6, COMT2* e *C4H3* que foram expressos em apenas algumas amostras analisadas, tais como córtex da medula 3, medula do entrenó 5, córtex e medula do entrenó 9. O último grupo (G4) contém genes que não foram expressos ou que não foram expressos em nível detectável por RT-qPCR, tais como *CSE1, CCR3, CAD1, 4CL5, 4CL3* e *4CL1*.

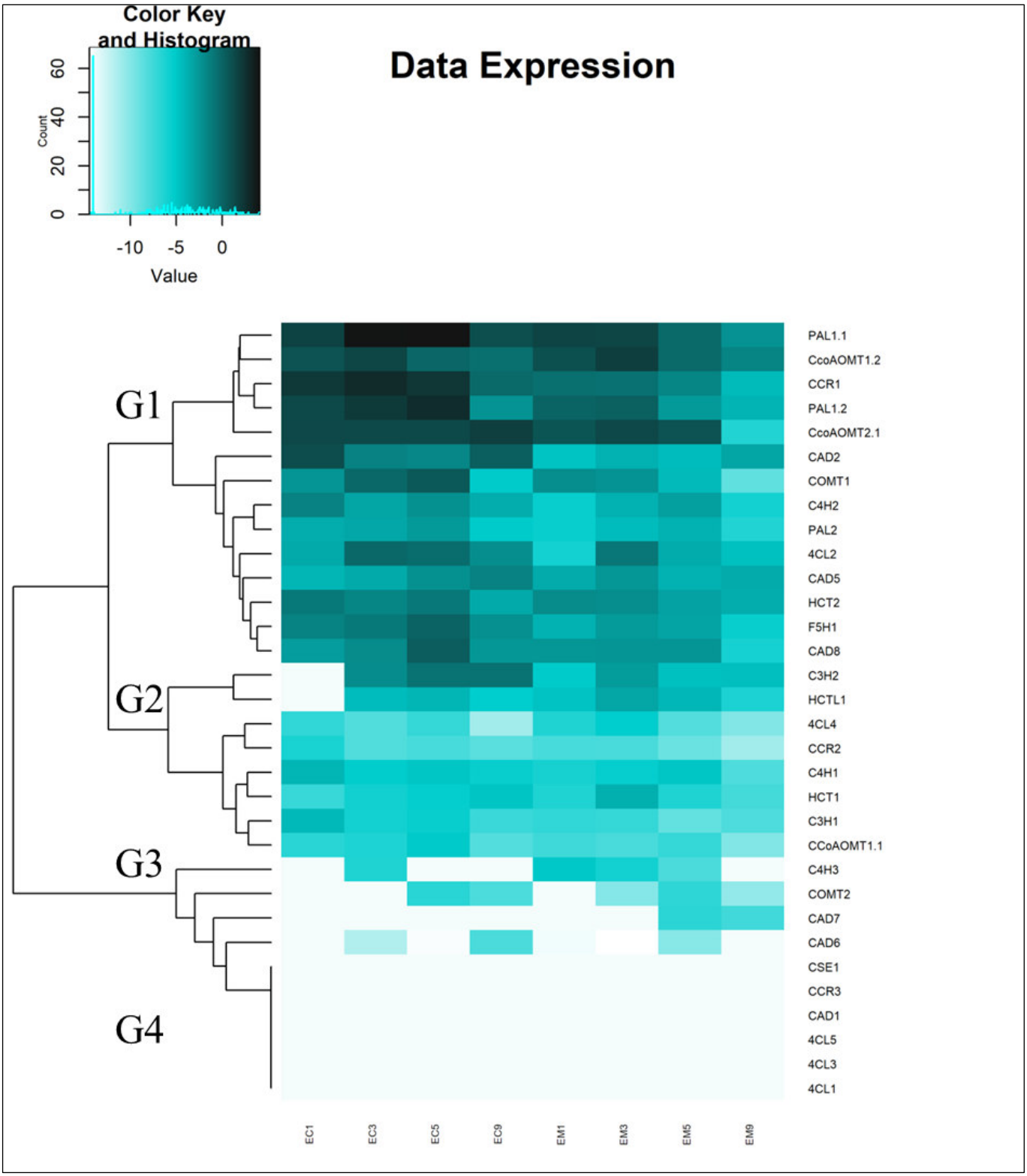
O gene *CSE1* foi o único gene desse agrupamento que apresentou amplificação em todas as amostras dentro dos parâmetros determinados pelo teste de padronização dos *primers*, evidenciando que há expressão deste gene nas amostras analisadas, porém muito baixa quando comparado a outros genes analisados ou ainda que este gene possua o nível de expressão muito variável (Figura 6).

Figura 5 - Curva de amplicação do gene *CSE1* em amostras de entrenó 1, 3, 5 e 9 (córtex e medula) do híbrido 89 de cana-de-açúca (*Saccharum* spp.). (a) – Curva de amplificação em amostras sem o cDNA, sem pico padrão, sendo o controle negativo e (b) – curva de amplificação em amostras com cDNA, com pico padrão. Todas as amostras foram diluídas em 1:50.



Fonte: Autoria própria

Figura 6 – Análise de expressão dos genes da via de biossíntese dos monolignóis em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Representação por *heatmap* da expressão relativa de 32 genes ao longo do desenvolvimento do entrenó 1, 3, 5 e 9 das regiões do córtex (EC) e medula (EM) em amostras do híbrido 89 de cana-de-açúcar. O nível de expressão é representado pelo gradiente de cores variando da cor mais escura (preto) até a cor mais clara (branco), representam alta e baixa ou nula expressão gênica. O agrupamento hierárquico foi conduzido para as amostras biológicas (vertical) e para os genes (horizontal) revelando quatro agrupamentos (G). (G1) representa os genes mais expressos, (G2) genes de expressão intermediária, (G3) genes de expressão pontual e (G4) genes que não foram expressos nas amostras analisadas. Para o cálculo da expressão gênica relativa foi usado o gene *GAPDH* de expressão constitutiva (LING et al., 2014).



Fonte: Autoria própria

Por apresentarem maior expressão, os genes do G1 foram selecionados para analisar o perfil de expressão por amostras. Para isto, foram realizadas análise de variação (*TWO WAY ANOVA*) .

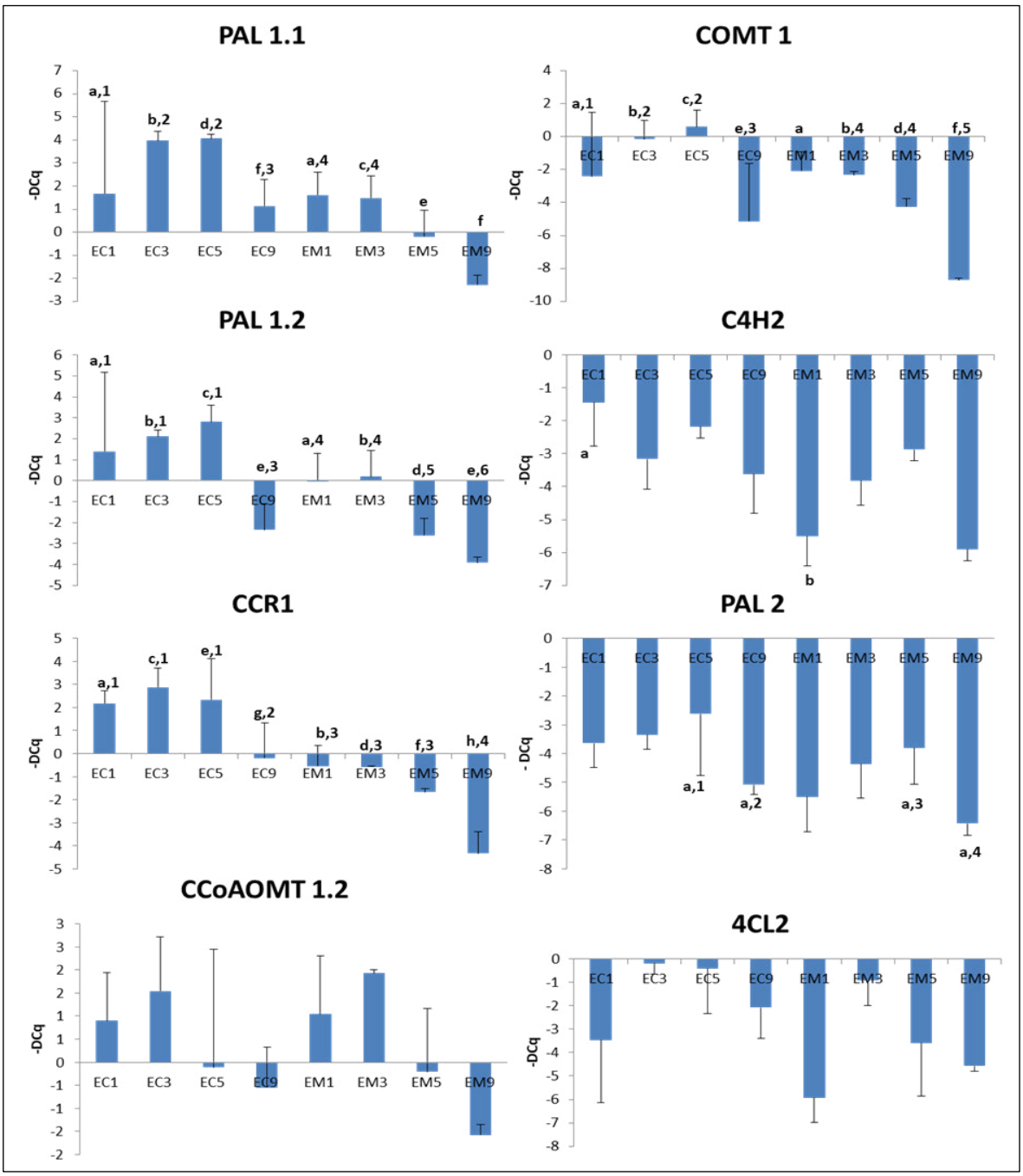
Os genes *PAL1.1, CCR1, CAD2* apresentaram diferenças estatísticas entre os diferentes estágios de desenvolvimento estudados e entre as diferentes partes do entrenó (córtex e medula). Para facilitar a interpretação textual, os tecidos estudados (córtex e medula) estarão com a numeração seguida referente ao estágio de desenvolvimento do entrenó. Assim, córtex 1 (EC1) e medula 1 (EM1), representa o tecido proveniente do entrenó 1, e assim sucessivamente. *PAL1.1* foi significantemente mais expresso no córtex 5 (EC5). Esse gene apresentou maior nível de expressão no córtex intermediário (EC5) em relação ao mais jovem (EC1) e a diminuir a expressão do tecido intemediario (EC5) para o mais maduro (EC9). Quando comparado o córtex e a medula *PAL1.1* tende a aumentar o nível de expressão quando comparamos o córtex e medula mais jovens (EC1 e EM1) e uma diminuição no nível de expressão quando comparamos medula e córtex mais maduros (EC9 e EM9). Essa tendência também pode ser observada nos genes *COMT1, CAD8, F5H1* e *PAL1.2.*

O gene *CCR1* não apresentou diferença estatística de expressão entre o córtex mais jovem (EC1) e o intermediário (EC3 e EC5), apenas entre estes e o córtex mais antigo (EC9). Este gene também apresentou diferenças estatísticas entre córtex e medula, mas não entre os estágios de maturação estudados da medula.

O gene *CAD2* demostrou tender a diminuir a expressão do córtex para a medula sendo mais expresso no córtex mais jovem (EC1) e menos expresso na medula mais jovem (EM1).

Os genes *COMT1, PAL1.2, PAL2*, *CCoAOMT2.1, F5H1, CAD8* e *C4H2* apresentaram diferença significativa de expressão apenas entre alguns pontos analisados. O gene *PAL1.2* foi mais expresso em córtex 5 (EC5), mas não demostrou diferença significativa entre os tecidos mais jovem e intermediários do córtex (EC1, EC3 e EC5). Este gene demostrou diminuir o nível de expressão no córtex mais antigo (EC9), aumentando nos tecidos mais jovens da medula (EM1) e havendo diminuição no tecidos mais antigos da medula (EM9).

Figura 7 – Análise de expressão por PCR em tempo real (RT-qPCR) de genes possivelmente envolvidos na biossíntese dos monolignóis do híbrido 89 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Análise da expressão relativa por RT-qPCR de *PAL1.1*, *PAL1.2*, *CCR1*, *CCoAOMT1.2*, *COMT1*, *C4H2*, *PAL2* e *4CL2* usando duplicata biológica e triplicata técnica. O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado através do *GAPDH* de expressão constitutiva (Ling et al., 2014). As letras diferentes indicam diferença estatística dentro do mesmo entrenó (córtex e medula). Números indicam diferença estatística entre diferentes amostras (entrenós). Ausência de números e/ou letras indica que não houveram diferenças significativas.



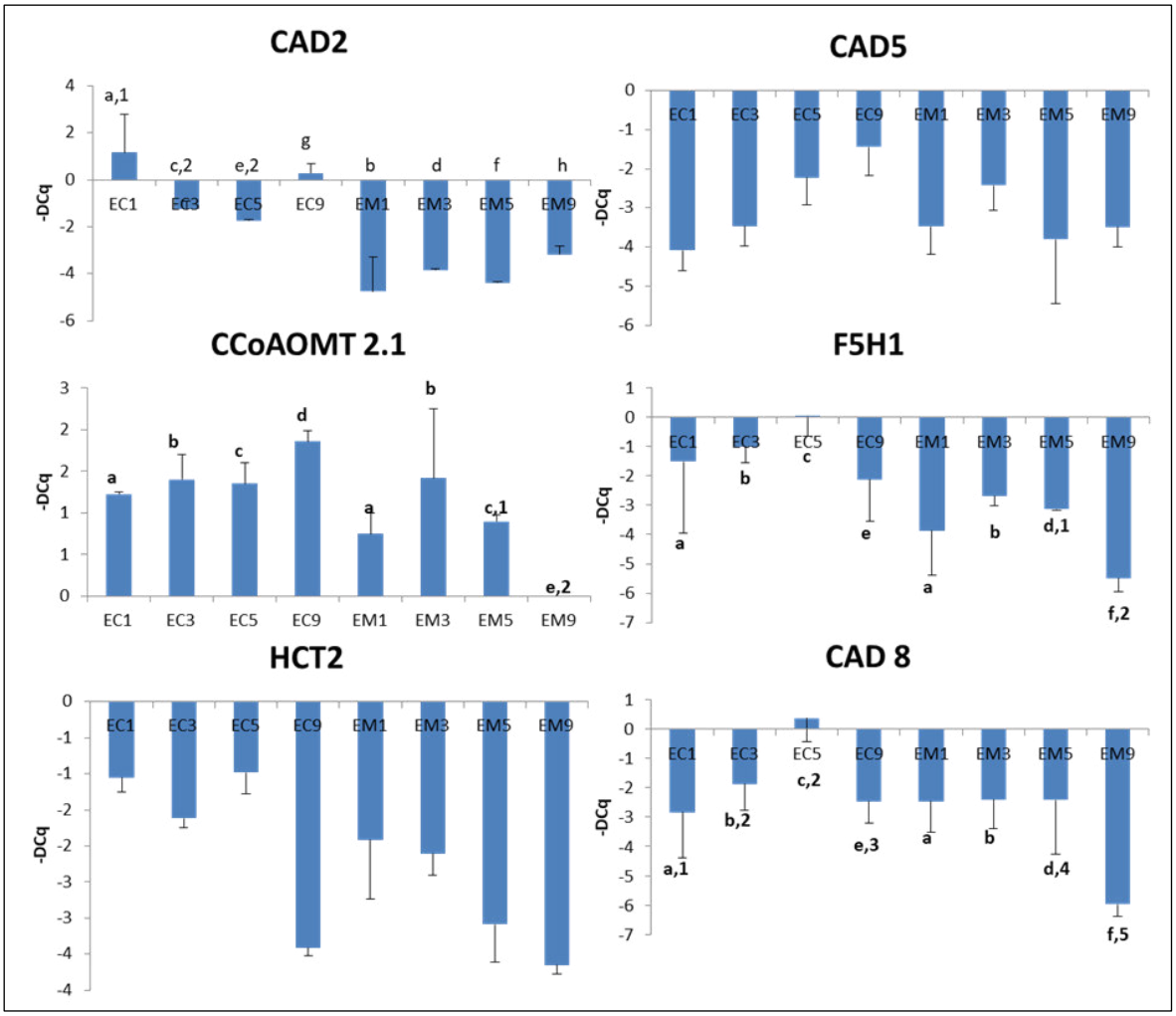
Fonte: Autoria própria

PAL2 apresentou diferença estatística apenas entre córtex 5 e córtex 9 e também entre medula 5 e medula 9, mas não entre córtex e medula. *F5H1* apresentou diferença estátisticas de expressão entre córtex 5 e córtex 9, sendo mais expresso no córtex 5.

CAD8 apresentou diferença estatística de expressão apenas entre medula e córtex 5 e entre córtex e medula 9. O gene *C4H2* foi mais expresso na córtex 1 e menos expresso na medula.

Os genes *CAD5, HCT2, CCoAOMT1.2* e *4CL2* não apresentaram diferentes níveis de expressão entre os diferentes estágios de desenvolvimento.

Figura 8 - Análise de expressão por PCR em tempo real (RT-qPCR) de genes possivelmente envolvidos na biossíntese dos monolignóis do híbrido 89 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Análise da expressão relativa por RT-qPCR de *CAD2*, *CCoAOMT2.1*, *HCT2*, *CAD5*, *F5H1* e *CAD8* usando duplicata biológica e triplicata técnica. O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado através do *GAPDH* de expressão constitutiva (Ling et al., 2014). Letras diferentes indicam diferença estatística dentro do mesmo entrenó (córtex e medula). Números indicam diferença estatística entre diferentes entrenós. Ausência de números e/ou letras indica que não foram encontradas diferenças significativas.



Fonte: Autoria própria

7. DISCUSSÃO

Um total de 37 genes *bona fide* possivelmente envolvidos na biossíntese de monolignóis de cana-de-açúcar foi identificado e anotado por análises de bioinformática e filogenéticas (FERRAZ, 2016). Para identificar quais genes estão envolvidos funcionalmente nesta via, o presente trabalho propôs correlacionar o perfil de expressão com os quatro estágios de desenvolvimento do entrenó, separando córtex e medula, os quais estão associados aos estágios de lignificação em maior e menor grau, respectivamente.

Alguns trabalhos vêm explorando o nível de expressão dos genes *bona fide* da via de biossíntese de lignina em cana-de-açúcar. Dentre estes, Bottcher et al., 2013 analisaram a expressão de 28 genes em amostras de córtex e medula dos entrenós, 1-3 (jovem), 5-7 (intermediário) e 15-17 (maduro) em genótipos com baixa (4,56%) e alta concentração (8,2%) de lignina, segundo os parâmetros bioquímicos utilizado no trabalho. Os autores relacionaram o estágio de desenvolvimento do entrenó (córtex e medula), a concentração de lignina, a quantidade dos monolignóis com o nível de expressão gênica e identificaram alguns padrões. Dentre estes, os autores destacaram os genes mais envolvidos na lignificação durante o desenvolvimento em cana-de-açúcar, tais como *ShPAL1, ShC4H1, Sh4CL2, ShC3H1, ShCCoAOMT1, ShF5H, ShCOMT, ShCAD2 e ShCAD8*. Já no trabalho de BEWG; COLEMAN, 2017, os autores identificaram que não houve diferenças significativas nos níveis de expressão entre o tecido radicular e as cinco seções do colmo testadas (A a E) para *C3H*, *CCoAOMT*, *F5H* e *CAD*. Dentre estes, *C3H*, *CCoAOMT* e *F5H* mostraram platô de expressão durante o desenvolvimento. Apesar destes avanços, o presente trabalho identificou 34 transcritos expressos, 26 genes foram identificados, sendo 7 genes adicionais aos previamente descritos na literatura (tabela 1).

Tabela 1 - Genes possivelmente envolvidos na via de biossíntese de monolignol. Tabela representa comparação entre genes descritos anteriormente e os 26 genes expressos presente trabalho. *Indica que este gene foi identificado no trabalho mencionado. Em vermelho gene expresso apenas no presente trabalho.

Gene	Bottcher et al.,2013	Vicentini et al., 2015	Bewg et al., 2017	Autor, 2019
PAL1.1	*		*	*
PAL1.2				*
PAL2	*	*		*
4CL1	*	*	*	
4CL2	*			*
4CL4				*
4CL5		*		
CAD2	*	*	*	*
CAD5				*
CAD6	*	*		*
CAD7	*	*		*
CAD8	*	*		*
CCR1	*	*	*	*
CCR2	*			*
HCT1	*	*		*
HCT2				*
HCT-L1	*			*
COMT1	*	*	*	*
COMT2				*
CCoAMT1.1	*	*	*	*
CCoAMT1.2				*
CCoAMT2.1		*		*
C3H1	*			*
C3H2	*		*	*
C4H1	*	*	*	*
C4H2	*	*		*
C4H3				*
F5H1	*	*	*	*

Fonte: Bottcher et al.,2013; Vicentini et al., 2015; Bewg et al., 2017.

O agrupamento número 1 (G1) gerado pelo *heatmap* (figura 5) reúne os genes mais expressos dentre os estudados. Deve-se atentar para o fato que esse agrupamento possui praticamente um gene de cada família gênica envolvida na biossíntese dos monolignóis, tais como, *PAL1.1, COMT1, CAD2, 4CL2, CAD5, F5H1, CAD8, CCoAMOT2.1, CCoAMOT1.2, PAL1.2* e *CCR1*. Destaca-se a expressão de *PAL1.1*, o qual obteve o maior nível de expressão nas amostras analisadas, obtendo o máximo de expressão no córtex 3 e 5 e menor expressão na medula 9. Além disso, destaca-se que algumas famílias gênicas, tais como PAL, CCoAOMT e CAD por possuírem mais de um representante ativo.

Provavelmente, isso ocorre porque alguns desses genes estão atuando de maneira alternativa ou redundante na via. Sendo assim, pode-se especular que os genes mais expressos de cada família gênica seriam aqueles mais envolvidos na via principal.

PAL é uma das principais enzimas da via dos fenilpropanóides. Catalisa L-fenilalanina a amônia e ácido transcinâmico, a partir dos quais compostos fenólicos são produzidos. Os altos níveis e o padrão de expressão encontrado neste trabalho corroboram com as funções já descritas para essa enzima. Uma vez que a enzima PAL é a primeira da via, seu alto nível de expressão em tecidos jovens pode indicar o direcionamento do fluxo metabólitos para a produção de compostos com a lignina (BEWG; COLEMAN, 2017), assim como de outros compostos envolvidos na defesa da planta contra estresse ambiental e patógenos, tais como flavonoides (KASIRAJAN et al., 2017; MCNEIL et al., 2018).

Em estudo para o silenciamento gênico da *PAL* em arroz transgênico utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi), os níveis de PAL foram regulados negativamente (FANG et al., 2013). Observou-se que as concentrações de compostos fenólicos nos tecidos radiculares e nos exsudatos radiculares também foram menores nas plantas transgênicas do que nos controles, sugerindo que a regulação negativa da expressão de *PAL* diminui a expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo fenólico. Assim, *PAL* pode desempenhar um papel na regulação da expressão gênica em enzimas relacionadas ao metabolismo fenólico e na síntese e liberação de fenólicos.

Em *Brachypodium distachyon,* a regulação negativa do gene *BdPTAL1* levou a reduções do conjunto de várias flavonas e derivados flavonóis, indicando que a via TAL também fornece substratos para a biossíntese de flavonóides. Este caminho diverge da via de biossíntese de monolignol ao nível de coumaroil-CoA. A posição da PTAL na interface do metabolismo primário e secundário sugere que a manipulação de PTAL em gramíneas também pode afetar o metabolismo primário, como observado pelo aumento dos níveis de ácido quínico (e o seu éster ácido clorogênico) em plantas com regulação negativa de *BdPTAL1*. Estudos adicionais são necessários para determinar se existem papéis diferenciais para PAL e PTAL na biossíntese de flavonoides (BARROS et al., 2016). Em cana-de-açúcar, um estudo com miRNA avaliou a expressão de enzimas envolvidas na via dos fenilpropanoides quando há infecção por fungo na planta, eles demostraram haver um aumento significativo de expressão e de atividade enzimática tanto da *PAL* quanto da *TAL* de acordo com a evolução do processo infeccioso (SU et al., 2019), o alto nível de

expressão deste gene, encontrado pelo presente trabalho, poderia está associado a capacidade de sintetizar 4-cumarato a partir da tirosina, uma vez que *PAL* está envolvido em outros processos metabólicos e de regulação, além da via de biossíntese de lignina.

Os genes *CCoAOMT1.2* e *CCoAOMT2.1* também exibiram padrões de expressão destacadamente altos o que corrobora com o importante papel desses genes que estão envolvidos não só nas etapas de metilação necessárias para a biossíntese de monolignóis, mas também de fenólicos solúveis Podemos supor que os altos níveis de expressão destes também possam estar relacionados à síntese de outros compostos fenólicos em cana-de-açúcar (VICENTINI et al., 2015). Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos que demostraram que esses genes apresentavam pouco ou nenhuma variação de expressão durante a maturação do colmo em cana-de-açúcar (BOTTCHER et al., 2013; BEWG; COLEMAN, 2017) .

A família CCR tem como função converter ésteres de hidroxicinolil-CoA a aldeídos hidroxicinâmicos, usando NADPH como redutor (VAN PARIJS et al., 2015). Em *Switchgrass* (*Panicum virgatum*) observou-se que esses genes apresentaram diferentes padrões de expressão em estágios de desenvolvimento distintos, quando testados em raiz, folha, flores e entrenó. *CCR1* apresenta-se mais correlacionado a estágios mais imaturos da planta, enquanto que *COMT e CAD* a estágios mais maduros (SHEN et al., 2009). Em *Arabidopsis thaliana* e *Eucalyptus grandis* o gene *CCR1* mostrou-se preferencialmente expresso em tecidos vasculares em desenvolvimento, reforçando sua função na biossíntese da lignina durante o desenvolvimento (CAROCHA et al., 2015). Considerando o alto padrão de expressão observado em córtex do gene *CCR1* (Figura 8), pode-se inferir que o padrão encontrado está relacionado à formação de subunidades H em tecidos em processo de amadurecimento, uma vez que gramíneas possuem um teor relativamente alto dessa subunidade quando comparado à lignina em eudicotiledôneas (VANHOLME et al., 2010).

COMT e F5H atuam em um segmento específico da via de biossíntese de lignina levando a formação da subunidade S (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010). O padrão alto de expressão dos genes *COMT1* e *F5H1* encontrados no presente trabalho indicam o envolvimento desses genes na formação da subunidade S, durante o processo de amadurecimento do entrenó, uma vez que ambos os genes foram mais expressos em tecido intermediário (EC5). Em *Arabidopsis thaliana, F5H1* apresenta expressão crescente durante o desenvolvimento da haste da inflorescência (RAES, 2003). O silenciamento

gênico de *COMT1* em cana-de-açúcar através do RNAi, demonstrou que a lignina de plantas transgênicas foi composta significativamente de menos unidades S e quantidade similar de unidades G em relação ao tipo selvagem (JUNG et al., 2012, 2016). Bewg et al. 2017, também encontraram mudanças significativas na relação S/G da lignina em favor da subunidade G através do silenciamento de *F5H* por RNAi. A diminuição de monômeros S associada ao silenciamento de *F5H* e *COMT* pode melhorar a hidrólise enzimática sem haver redução no teor de lignina. Outro estudo em cana-de-açúcar demostrou que há um aumento da relação S-G nas regiões de medula durante a maturação do caule, uma vez que há aumento da subunidade S dos entrenós intermediários e maduros, provavelmente devido à lignificação das células do parênquima, que são mais numerosas do que os feixes vasculares (BOTTCHER et al., 2013).

O presente trabalho identificou no agrupamento 1 (G1), três diferentes genes (*CAD2*, *CAD5* e *CAD8*), dafamília gênica CAD os quais exibem padrões diferentes de expressão, tais como, *CAD2* preferencialmente expresso em tecido mais jovem, *CAD5* não apresentou diferença de expressão entre os estágios de desenvolvimento estudados e *CAD8* preferencialmente expresso em tecido mais maduro, indicando que possam possuir funções sobrepostas de interação proteína-proteína, redundantes ou mesmo diferentes dentro da via. A família gênica CAD é responsável pela última etapa de formação do monolignol, convertendo os aldeídos das etapas anteriores aos álcoois correspondentes as três subunidades formados da lignina (KIEDROWSKI et al., 1992). Não há descrição até então dentre os membros dessa família qual gene estaria envolvido na formação de qual subunidade ou se um gene assume a função principal. Em cana-de-açúcar, a expressão de *CAD2* foi relacionada a tecidos de medula madura (BOTTCHER et al., 2013) enquanto que seus altos níveis de expressão, assim como sua ortologia com *SbCAD2* de sorgo indicam um papel constitutivo na lignificação em cana de açúcar (VICENTINI et al.,2015), essa tendência não foi observada pelo presente trabalho uma vez que *CAD2* foi mais expresso em tecido jovem. Outros estudos indicam que a família CAD também está envolvida na maturação do colmo, uma vez que em *Switchgrass* apresentou menor expressão nos tecidos mais jovens da planta (SHEN *et al.,*2009), tendência essa também observada em cana-de açúcar (BEWG et al.,2017) e no presente trabalho.

O gene *4CL*, realiza o terceiro passo da via geral do fenilpropanóides, onde ácido *p*-cumárico é converido a *p*-cumaril-CoA (BONAWITZ et al., 2010). No presente trabalho, o gene *4CL2* não apresentou diferenças significativas de expressão durante o

desenvolvimento do colmo, enquanto que *4CL1* não foi expressa em nenhuma das amostras analisadas. Estes dados contrapõem analises anteriores (JUNG; ALTPETER, 2016) de expressão da família 4CL, onde mostraram que os transcritos *4CL1* foram mais abundantes em comparação com *4CL2* em todos os diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento e que os níveis de expressão de *4CL1* foram aumentados à medida que os entrenós amadureceram, enquanto o *4CL2* apresentou os maiores níveis de expressão no entrenó mais jovem analisado. Além disso, o *4CL1* foi expresso preferencialmente nos tecidos epidérmicos e vasculares em comparação aos tecidos maduros, enquanto o *4CL2* apresentou maior expressão nos tecidos maduros (JUNG; ALTPETER, 2016).

Curiosamente, dentre os genes necessários para biossíntese de lignina ausentes no G1, estão os genes *C3H*. Estes genes foram identificados no agrupamento 2 (G2), relacionado a genes com padrão intermediários de expressão. Os genes *C3H,* assim como *C4H* catalisa as etapas de hidroxilação da via principal de biossíntese de lignina. Linhagens nocaute para o gene *C3H* em arroz demostraram, assim como havia sido demostrado anteriormente para *Arabidopsis thaliana*, um grande comprometimento no desenvolvimento da planta demostrando que níveis de expressão desse gene são necessários para o desenvolvimento da planta em gramíneas (monocotiledôneas), assim como em eudicotiledôneas (TAKEDA et al., 2018).

O gene *C4H2* foi mais expresso que *C4H1*, indicando que este seria o gene envolvido na via principal de síntese de monolignois em cana-de açúcar. Além disso, *C4H2* não exibiu diferença de expressão entre cortex e medula. Em Eucalipto essa tendência também foi observada uma vez que *C4H2* foi apontado como gene principal envolvido na via, porém *C4H1* mostrou-se preferencialmente expresso no xilema (CAROCHA et al., 2015).

No agrupamento 2, identifica-se os seguintes genes ativos: *C3H2, 4CL4, C3H1, CCoAOMT1.1, C4H1, HCTL1, HCT2, PAL2* e *C4H2*. Quanto a *CCoAOMT1.1* e *HCTL1* estudos em cana-de-açúcar identificaram que a expressão esta intimamente ligada à relação S-G (BOTTCHER et al., 2013). A diferença de expressão do gene *HCT2* observada entre córtex e medula pode indicar uma relação tecido específica. Em *Arabidopsis thaliana HCT* é expresso em todos os tecidos, mas preferencialmente em tecidos em desenvolvimento (RAES, 2003).

O gene *CAD7,* pertencente ao agrupamento 3 (G3)*,* que foi expresso em apenas algumas amostras analisadas, tais como medula 5, córtex e medula 9, demonstrando estar relacionado a características específicas de determinados estágios de maturação das plantas, uma vez que mostra um perfil de expressão bem pontual, muito diferente do perfil encontrado em arroz onde a diminuição do nível de expressão desse gene resulta em uma redução drástica da quantidade de lignina no caule da planta (LI *et al.,* 2009). Um perfil semelhante ao encontrado no G3 foi encontrado no grupamento 4 (G4), onde os genes obtiveram perfil de expressão baixo e pontual.

8. CONCLUSÃO

Distintos estágios do desenvolvimento do entrenó do híbrido 89 (H89) de cana-de-açúcar foram avaliados quanto ao padrão de expressão de genes possivelmente envolvidos na biossíntese dos monolignols. Dentre as 37 sequencias candidatas identificadas por bancos transcriptômicos (RNA-seq e SUCEST), 34 transcritos foram padronizados para análise em PCR em tempo real (RT-qPCR) e 26 foram identificados como gene envolvidos no processo de lignificação do colmo em cana-de-açúcar, sendo 7 transcritos adicionais em relação a descrição presente na literatura. O presente estudo demonstrou a existência de um conjunto de genes possivelmente envolvidos na biossíntese de monolignol com expressão associadas as distintas fases de desenvolvimento do entrenó de cana-de-açúcar, sendo eles *PAL1.1, CCoAOMT1.2*, *CCR1*, *PAL1.2*, *CCoAOMT2.1*, *CAD2*, *COMT1*, *C4H2*, *PAL2*, *4CL2*, *CAD5*, *HCT2*, *F5H1* e *CAD8*.

REFERÊNCIAS

ACHNINE, L. et al. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 16, nov, p. 3098–3109, 2004.

BAK, S. et al. Cytochromes P450. **The Arabidopsis Book**, v. 9, p. e0144, 2011.

BALAT, M; BALAT, H; ÖZ, C. **Progress in bioethanol processing**. Progress in energy and combustion science, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

BALLESTER, A. R.; LAFUENTE, M. T.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-Penicillium digitatum interaction. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, n. 2, p. 115–124, 2006.

BARROS, J. et al. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. **Nature Plants**, v. 2, n. 6, p. 1–9, 2016.

BAUCHER, M. et al. Critical Reviews in Plant Sciences Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 2, p. 125–197, 1998.

BEWG, W. P.; COLEMAN, H. D. Cell wall composition and lignin biosynthetic gene expression along a developmental gradient in an Australian sugarcane cultivar. **PeerJ**, v. 5, p. e4141, 2017.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 72, p. 51–56, 1992.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003.

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 337–363, 2010.

BOTTCHER, A. et al. Lignification in Sugarcane: Biochemical Characterization, Gene Discovery, and Expression Analysis in Two Genotypes Contrasting for Lignin Content. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1539–1557, 2013.

BOUDET, A. M. et al. Lignins and lignocellulosics: A better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 12, p. 576–581, 2003.

BOUDET, A. M. Lignins and lignification: Selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1–2, p. 81–96, 2000.

BURTON, R. A. et al. Cellulose synthase-like CslF genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)-β-D-glucans. **Science**, v. 311, n. 5769, p. 1940–1942, 2006.

CARDONA, C. A. Fuel Ethanol Production : Process Design Trends and Integration.**Trends in Plant Science**.Oct. 2017.

CAROCHA, V. et al. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of Eucalyptus grandis. **New Phytologist**, Agt. 2015.

CARPITA, N. C. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 445–476, 1996.

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.

CARPITA, N. The cell wall. **Biochemistry and molecular biology of plants**, p. 52-108, 2000.

CARPITA, N.; TIERNEY, M.; CAMPBELL, M. Molecular biology of the plant cell wall: Searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1–2, p. 1–5, 2001.

CASU, R. E. et al. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. **Functional and Integrative Genomics**, v. 7, n. 2, p. 153–167, 2007.

CESARINO, I. et al. Building the wall: recent advances in understanding lignin metabolism in grasses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, 2016.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 759–761, 2007.

COSGROVE, D. J. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. **Current Opinion in Plant Biology,** v. 22, p. 122–131, 2014.

COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.

COSTA, T. H. F. et al. Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

DAI, J.; PATTI, A. F.; SAITO, K. Recent developments in chemical degradation of lignin : catalytic oxidation and ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 45, p. 4945–4951, 2016.

DENG, L. et al. Effects of postharvest oligochitosan treatment on anthracnose disease in citrus (Citrus sinensis L. Osbeck) fruit. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 4, p. 795–804, 2015.

D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J.C.. Oligoclonal interspecific origin of ‘North Indian’and ‘Chinese’sugarcanes. **Chromosome Research**, v. 10, n. 3, p. 253-262, 2002.

DIXON, R. A. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 5, p. 371–390, 2002.

DIXON, R. A. N. L. P. Stress-lnduced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 11, p. 1085–1097, 1995.

EUDES, A. et al. Lignin bioengineering. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 26, p. 189–198, 2014.

FANG, C. et al. Changes in Rice Allelopathy and Rhizosphere Microflora by Inhibiting Rice Phenylalanine Ammonia-lyase Gene Expression. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 204–212, 2013.

FERRAZ, G. R. **Identificação, anotação e análise filogenética das famílias gênicas envolvidas na via de biossíntese de lignina em cana-de-açúcar (Saccharum spp.)**. 2016. Dissertação (mestrado). 89 f. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, 2016.

GIRALDO, O. H. et al. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. **International Nuclear Information System**.v. 33, p. 385–399, 2008.

GRIVET, L. et al. A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 2, p. 009, 2004.

HARRIS, P. J.; SMITH, B. G. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: Structures, properties and uses in food products. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 129–143, 2006.

HENRY, R. J. et al. **Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants**. Cabi Publishing, 2005.

JUNG, J. H. et al. Precision breeding for RNAi suppression of a major 4-coumarate:coenzyme A ligase gene improves cell wall saccharification from field grown sugarcane. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 4–5, p. 505–517, 2016.

JUNG, J. H. et al. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 9, p. 1067–1076, 2012.

JUNG, J. H.; ALTPETER, F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 1–2, p. 131–142, 2016.

KASIRAJAN, L. et al. Molecular Cloning, Characterization, and Expression Analysis of Lignin Genes from Sugarcane Genotypes Varying in Lignin Content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1270–1282, 2017.

KIEDROWSKI, S. et al. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. **The EMBO journal**, v. 11, n. 13, p. 4677–84, 1992.

KOUKOL, J; CONN, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 10, p. 2692-2698, 1961.

LEE, D. et al. Antisense Suppression. **Society**, v. 9, Nov. 1997, p. 1985–1998, 1998.

LING, H. et al. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

LI, Xiangjun et al. **FLEXIBLE CULM: encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice**. Plant molecular biology, v. 69, n. 6, p. 685-697, 2009.

LOGEMANN, E.; PARNISKE, M.; HAHLBROCK, K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 13, p. 5905–5909, 1995.

MAEDA, H. A. Tyrosine shortcut in grasses. **Nature Plants**, v. 2, n. 6, p. 1–2, 2016.

MARCHESINI, A. B. **Estudo sistemático da deposição de lignina em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado), 2013. 163 f. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. 2013.

MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1–10, 2011.

MCCANN, M. C.; CARPITA, N. C. Designing the deconstruction of plant cell walls. **Current opinion in plant biology**. p. 314–320, 2008.

MCLAREN, J. S. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 339–342, 2005.

MCNEIL, M. D. et al. Analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during Sporisorium scitamineum infection using RNA-seq and microscopy. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–28, 2018.

MENDES, F. M. et al. Anatomic and Ultrastructural Characteristics of Different Regions of Sugar Cane Internodes Which Affect Their Response to Alkaline-Sulfite Pretreatment and Material Recalcitrance. **Energy and Fuels**, v. 30, n. 2, p. 1078–1084, 2016.

MOORE, P. H. **Sugarcane improvement through breeding**. Tese (Doutorado).1987.200 f. University of California.1987.

O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. **The plant cell wall**, p. 1-54, 2003.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 305–312, 2010.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; HONT, A. D. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics.** p. 65–73, 2010.

RAES, J. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133, n. 3, p. 1051–1071, 2003.

RALPH, J. et al. Elucidation of new structures in lignins of CAD-and COMT-deficient plants by NMR. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 993–1003, 2001.

RALPH, J. et al. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl CoA reductase deficiency). **Plant Journal**, v. 53, n. 2, p. 368–379, 2008.

REITER, W. D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 6, p. 536–542, 2002.

ROSLER, J. Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity. **Plant physiology**, n. 1 997, p. 175–179, 1997.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks**. Bioresource technology, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS BRITO, M. et al. Expression Profile of Sugarcane Transcription Factor Genes Involved in Lignin Biosynthesis. **Tropical Plant Biology**, v. 8, n. 1–2, p. 19–30, 2015.

SANTOS, A. B. **Estudo da deposição de lignina em genótipos de cana-de-açúcar sob condição de déficit hídrico e baixa temperatura**.2014. Tese (Doutorado). 114 f. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. 2014.

SAXENA, R. C. Ã.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes : A review. Renewable and Sustainable **Energy Reviews** v. 13, p. 167–178, 2009.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SHEN, H. et al. Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency. **Bioenergy Research**, v. 2, n. 4, p. 233–245, 2009.

SIQUEIRA, G. et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 2–10, 2011.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 2004.

SU, Y. et al. A dynamic degradome landscape on miRNAs and their predicted targets in sugarcane caused by Sporisorium scitamineum stress. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 57, 2019.

TAKEDA, Y. et al. Downregulation of p-COUMAROYL ESTER 3-HYDROXYLASE in rice leads to altered cell wall structures and improves biomass saccharification. **Plant Journal**, v. 95, n. 5, p. 796–811, 2018.

VAN PARIJS, F. R. D. et al. Clade classification of monolignol biosynthesis gene family members reveals target genes to decrease lignin in Lolium perenne. **Plant Biology**, v. 17, n. 4, p. 877–892, 2015.

VANHOLME, R. et al. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in arabidopsis. **Science**, v. 341, n. 6150, p. 1103–1106, 2013.

VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VANHOLME, R. et al. Lignin engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 278–285, 2008.

VARGAS, L. et al. Improving total saccharification yield of Arabidopsis plants by vessel-specific complementation of caffeoyl shikimate esterase (cse) mutants. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2016.

VÁRNAI, A. et al. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

VICENTINI, R. et al. Large-scale transcriptome analysis of two sugarcane genotypes contrasting for lignin content. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 301–307, 2008.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, n. 10, p. 1001–1013, 1995.

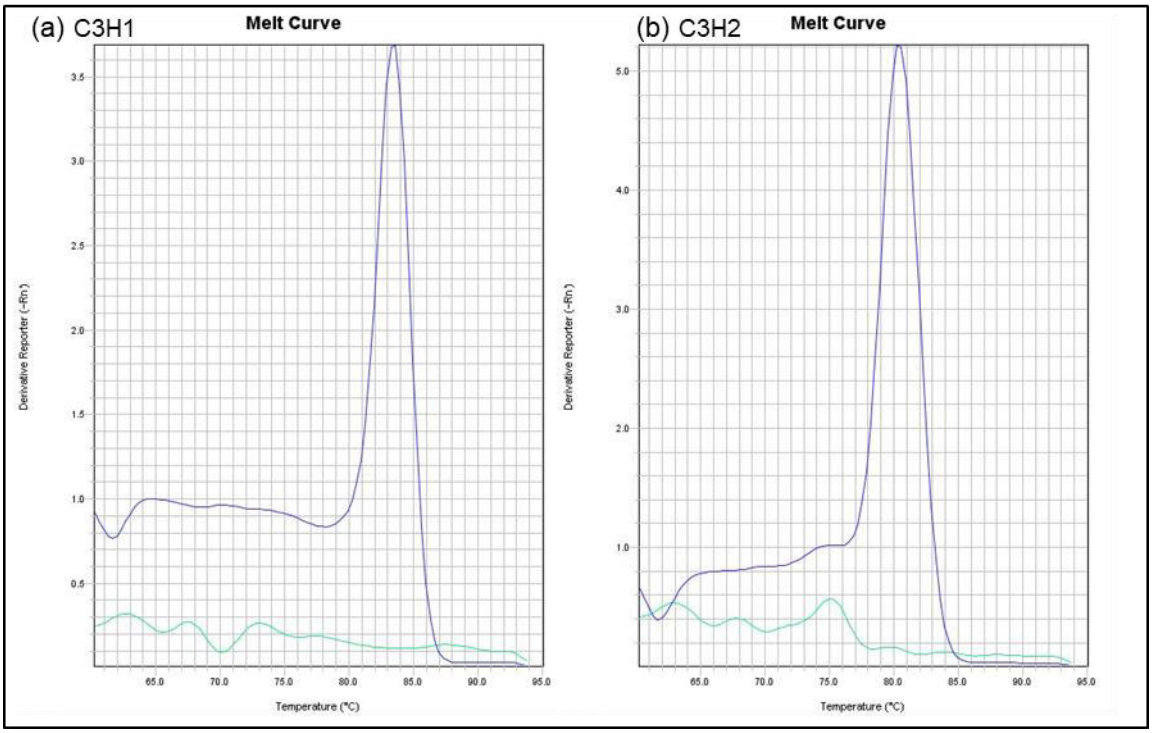
WYMAN, C. E. Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, n. 1, p. 189–226, 1999.

XU, Z. et al. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. SUPPL. 11, p. 1–15, 2009.

YUAN, J. S. et al. Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. **The Plant Journal** p. 491–503, 2008.

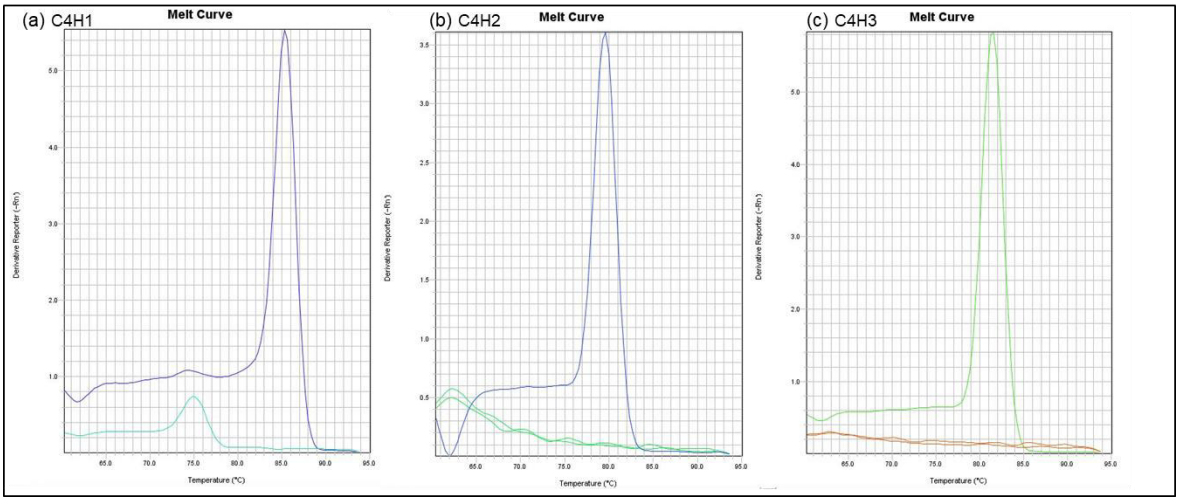
ANEXO A – CURVAS DE PADRONIZAÇÃO DOS *PRIMERS*

Figura A 1 - Curvas de amplificação dos genes *C3H1 e C3H2*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



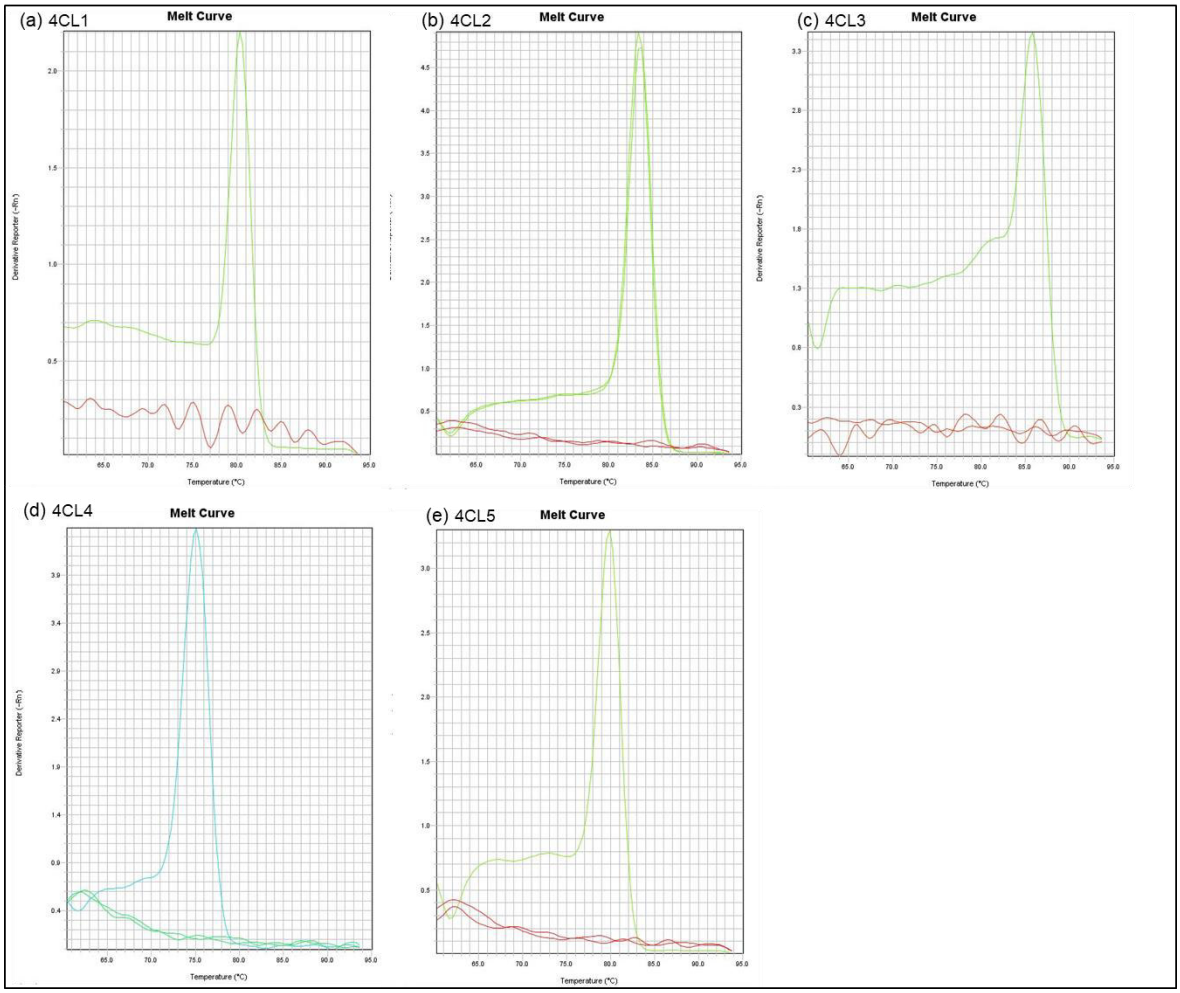
Fonte: Autoria própria

Figura A 2 - Curvas de amplificação dos genes *C4H1, C4H2 e C4H3*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



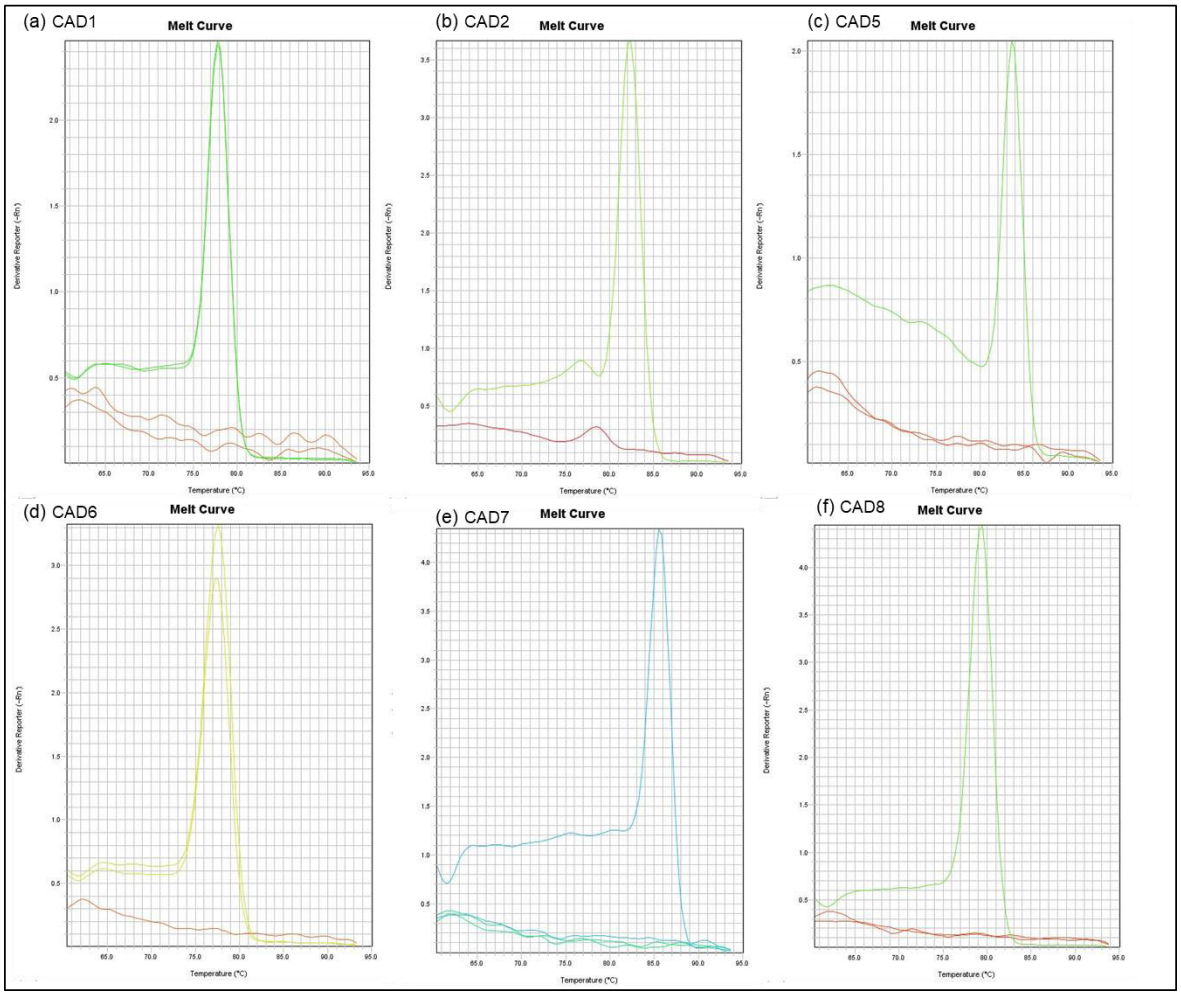
Fonte: Autoria própria

Figura A 3 - Curvas de amplificação dos genes 4CL1, 4CL2, 4CL3, 4CL4 e 4CL5. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



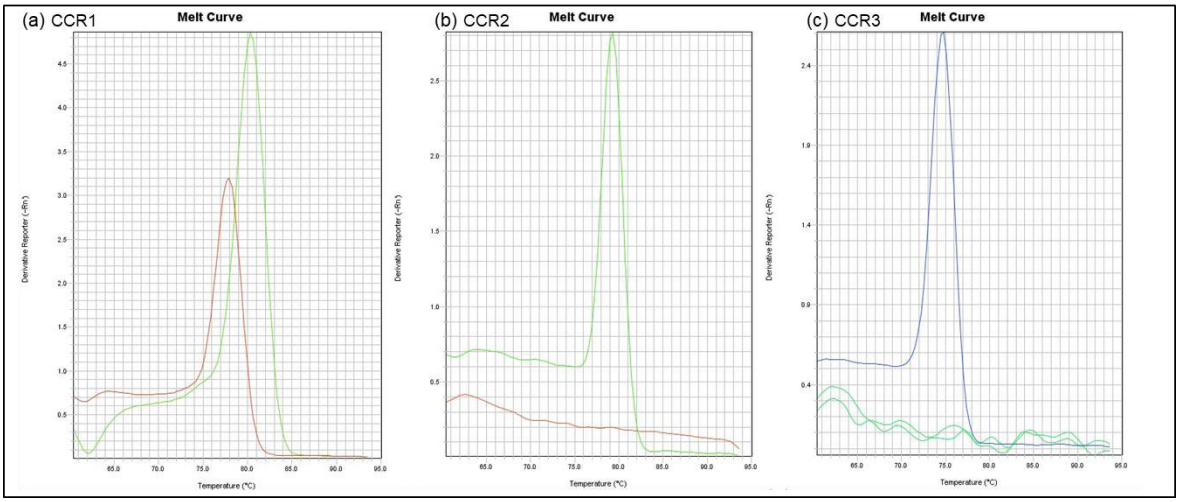
Fonte: Autoria própria

Figura A 4 - Curvas de amplificação dos genes *CAD1, CAD2, CAD5, CAD6, CAD7* e *CAD8*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



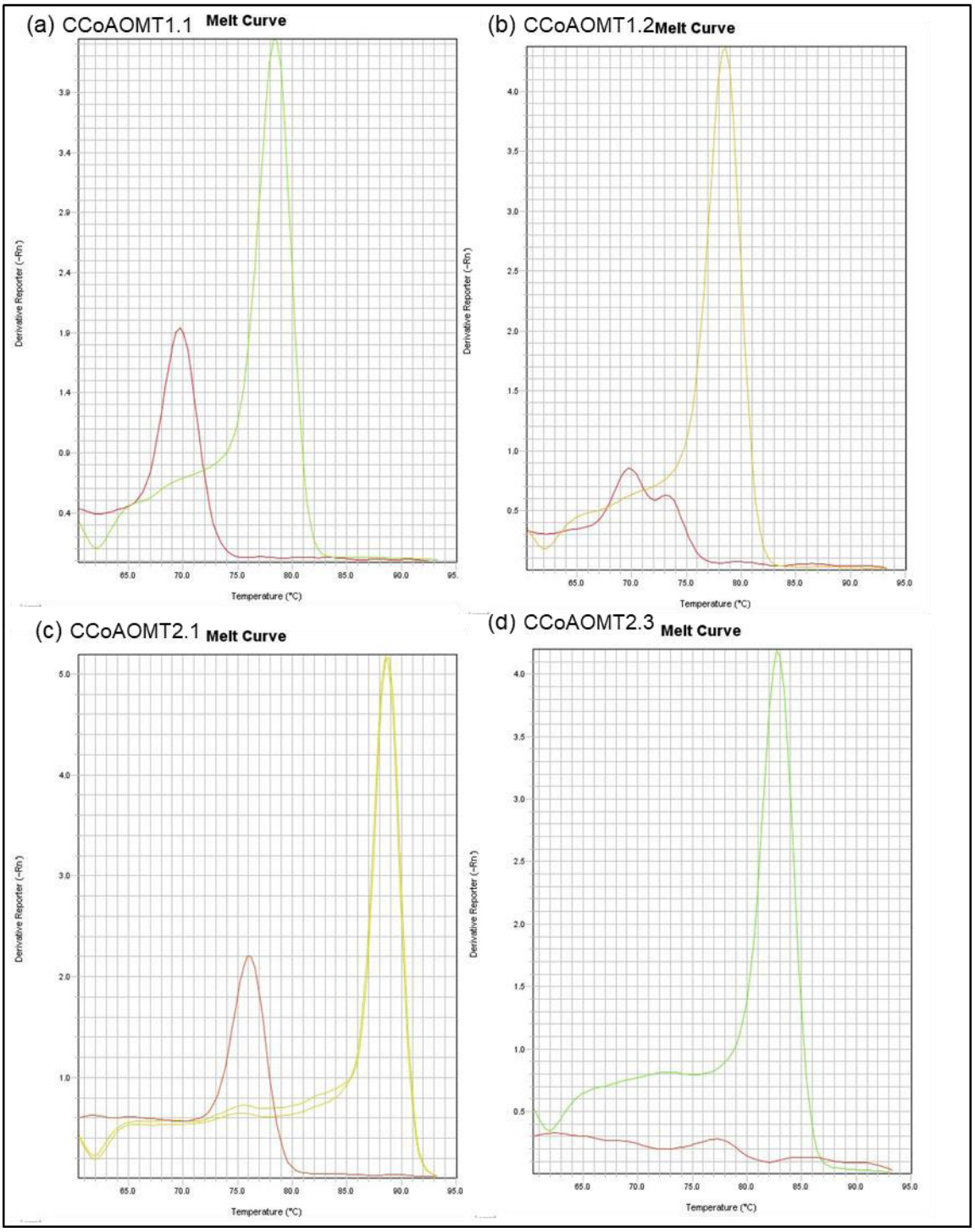
Fonte: Autoria própria

Figura A 5 - Curvas de amplificação dos genes *CCR1, CCR2* e *CCR3*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



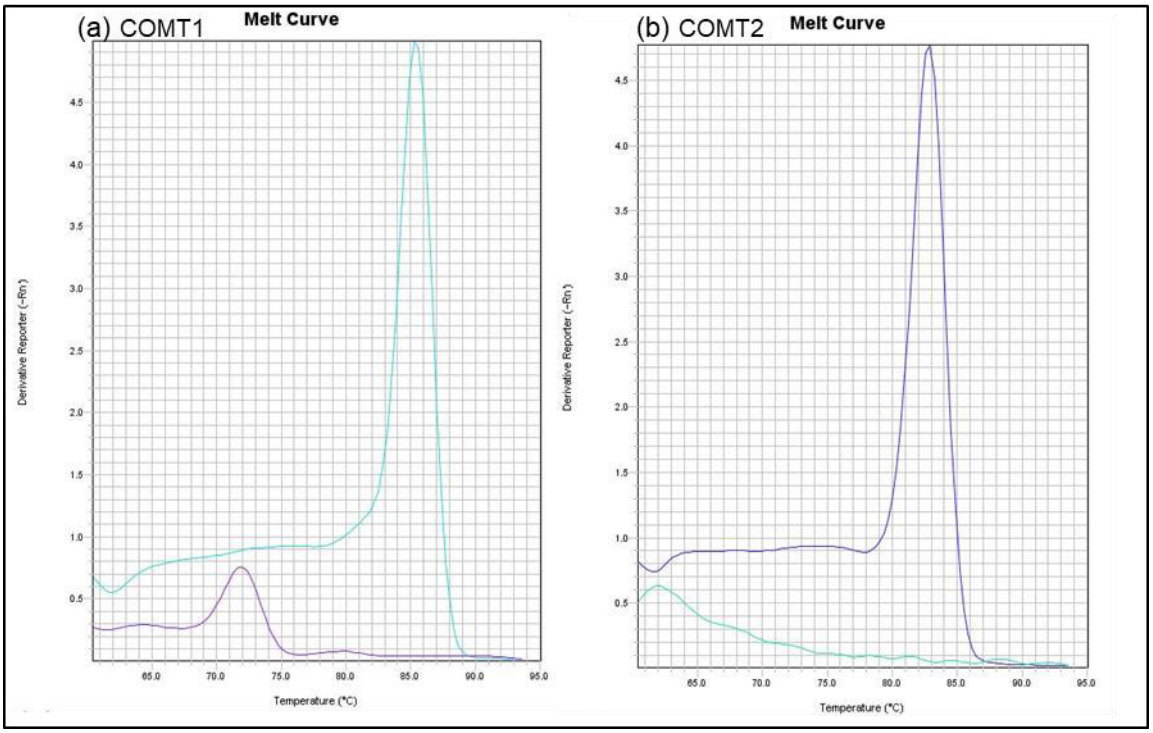
Fonte: Autoria própria

Figura A 6 - Curvas de amplificação dos genes *CCoAOMT1.1, CCoAOMT1.2, CCoAOMT2.3* e *CCoAOMT2.1*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



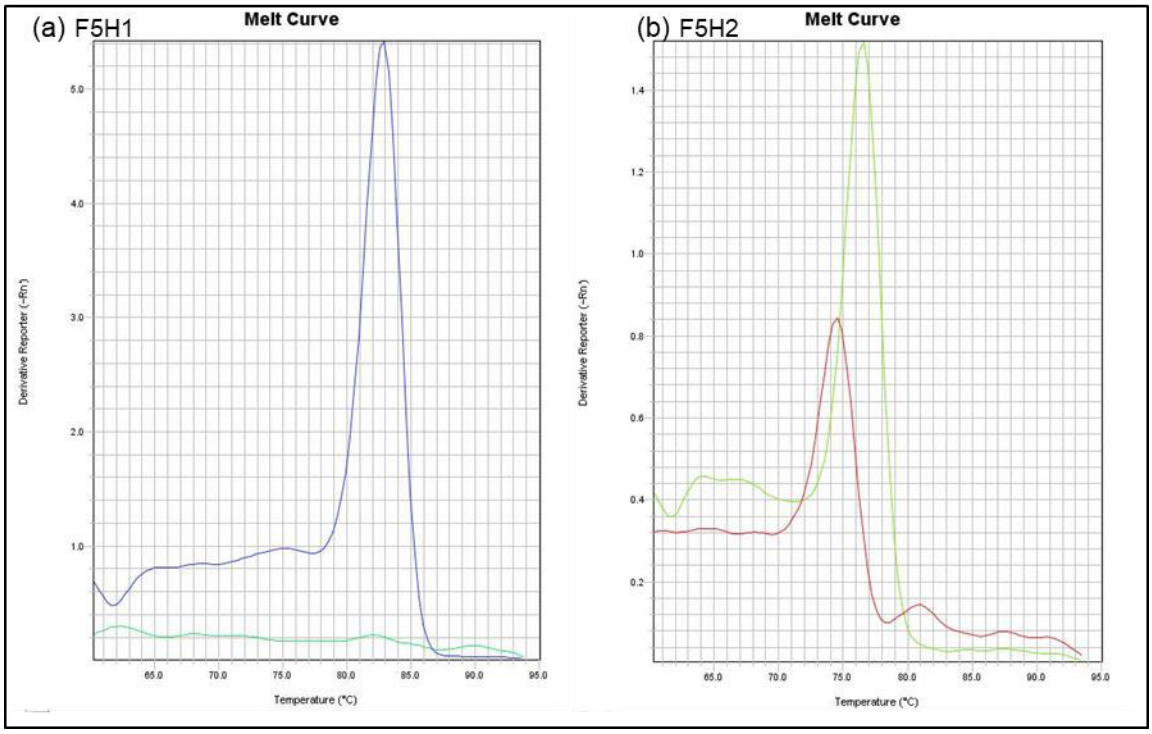
Fonte: Autoria própria

Figura A 7 - Curvas de amplificação dos genes *COMT1* e *COMT2*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



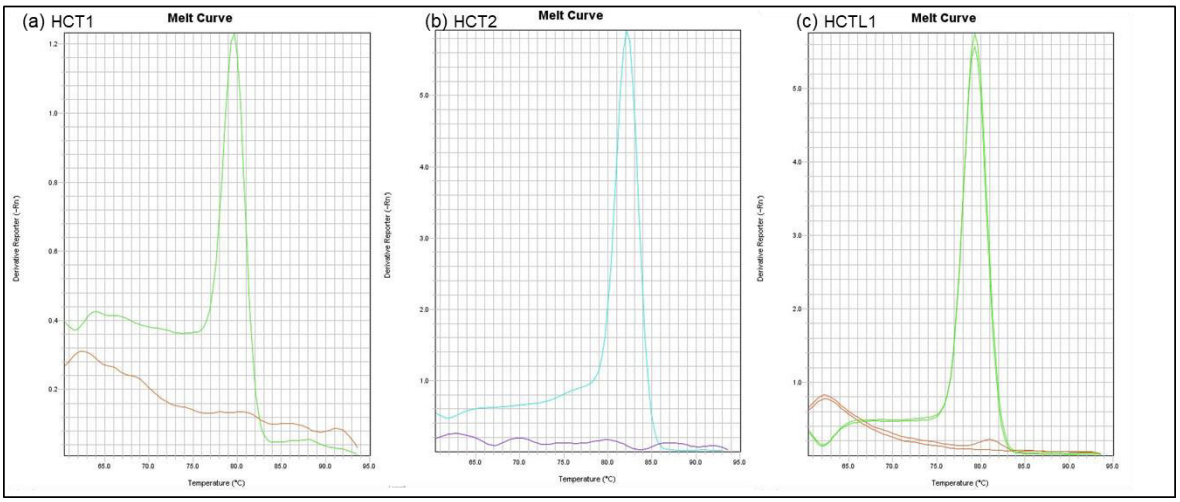
Fonte: Autoria própria

Figura A 8 - Curvas de amplificação dos genes *F5H1* e *F5H2*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



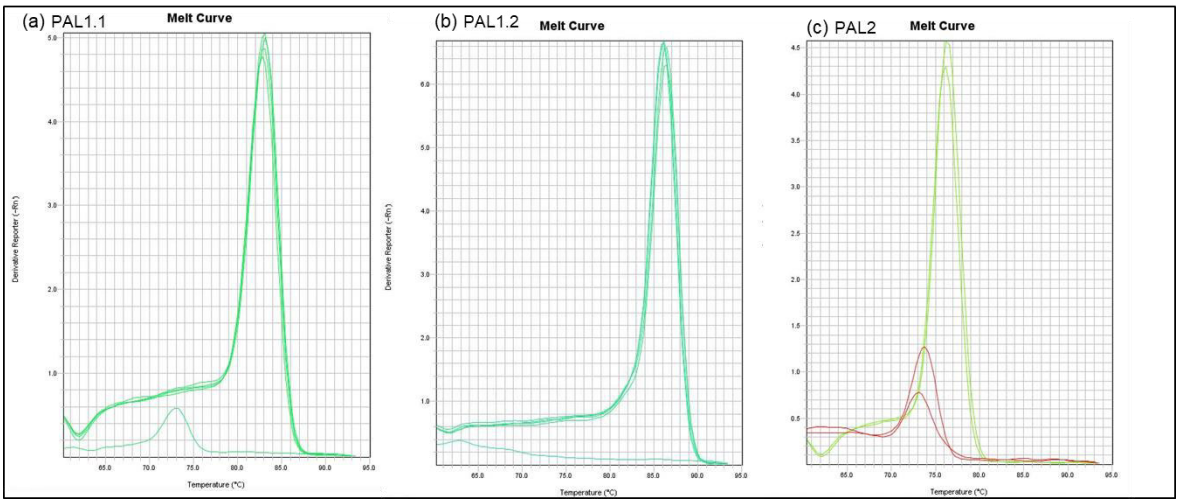
Fonte: Autoria própria

Figura A 9 - Curvas de amplificação dos genes *HCT1, HCT2* e *HCTL1*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação.



Fonte: Autoria própria

Figura A 10 -- Curvas de amplificação dos genes *PAL1.1, PAL1.2* e *PAL2*. Na figura, picos acima de 1.0 indicam a amplificação do gene. Linhas abaixo indicam controle negativo da reação



Fonte: Autoria própria

ANEXO B – SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS

Tabela B1 - Lista de *primers* desenhados e testados para cada gene.

Gene	Nome	Sequência	Produto	Tm	GC	Length
PAL1.1	RTq-ScPAL1.1 F	Informação protegida	85	59.6	50.0	20
	RTq-ScPAL1.1 R	Informação protegida	85	58.5	47.6	21
PAL1.2	RTq-ScPAL1.2 F	Informação protegida	106	60.9	55.0	20
	RTq-ScPAL1.2 R	Informação protegida	106	60.5	60.0	20
PAL2	RTq-ScPAL2 F	Informação protegida	122	59.3	55.0	20
	RTq-ScPAL2 R	Informação protegida	122	59.9	50.0	20
PAL2	RTq-ScPAL2N1 F	Informação protegida	86	59.1	55.0	20
	RTq-ScPAL2N1 R	Informação protegida	86	58.5	42.9	21
4CL1	RTq-Sc4CL1 F	Informação protegida	121	59.2	45.0	20
	RTq-Sc4CL1 R	Informação protegida	121	59.7	45.0	20
4CL2	RTq-Sc4CL2 F	Informação protegida	124	59.9	45.0	20
	RTq-Sc4CL2 R	Informação protegida	124	59.9	50.0	20
4CL3	RTq-Sc4CL3 F	Informação protegida	139	59.8	55.0	20
	RTq-Sc4CL3 R	Informação protegida	139	59.9	42.9	21
4CL4	RTq-Sc4CL4 F	Informação protegida	84	59.0	55.0	20
	RTq-Sc4CL4 R	Informação protegida	84	59.1	36.4	22
4CL5	RTq-Sc4CL5 F	Informação protegida	112	60.5	50.0	20
	RTq-Sc4CL5 R	Informação protegida	112	59.9	42.1	19
CAD2	RTq-ScCAD2 F	Informação protegida	105	60.0	61.1	18
	RTq-ScCAD2 R	Informação protegida	105	59.9	55.6	18
CAD2	RTq-ScCAD2N2 F	Informação protegida	99	60.0	60.0	20
	RTq-ScCAD2N2 R	Informação protegida	99	60.0	55.0	20
CAD2	RTq-ScCAD2N3 F	Informação protegida	108	60.0	55.0	20
	RTq-ScCAD2N3 R	Informação protegida	108	60.1	63.2	19
CAD2	RTq-ScCAD2N1 F	Informação protegida	98	60.0	55.0	20
	RTq-ScCAD2N1 R	Informação protegida	98	58.6	45.0	20
CAD6	RTq-ScCAD6 F	Informação protegida	101	60.5	61.1	18
	RTq-ScCAD6 R	Informação protegida	101	60.9	47.4	19
CAD7	RTq-ScCAD7 F	Informação protegida	115	59.8	57.9	19
	RTq-ScCAD7 R	Informação protegida	115	59.8	45.0	20
CAD5	RTq-ScCAD5 F	Informação protegida	117	60.1	55.0	20

(Continua)

(Continuação)

	RTq-ScCAD5 R	Informação protegida	117	59.7	50.0	20
CAD8	RTq-ScCAD8 F	Informação protegida	124	60.3	57.9	19
	RTq-ScCAD8 R	Informação protegida	124	60.0	45.0	20
CAD8	RTq-ScCAD8N1 F	Informação protegida	105	60.0	45.0	20
	RTq-ScCAD8N1 R	Informação protegida	105	60.0	60.0	20
CAD1	RTq-ScCAD1 F	Informação protegida	145	59.2	42.9	21
	RTq-ScCAD1 R	Informação protegida	145	60.6	50.0	20
CCR1	RTq-ScCCR1 F	Informação protegida	147	60.9	66.7	18
	RTq-ScCCR1 R	Informação protegida	147	60.0	50.0	20
CCR1	RTq-ScCCR1N1 F	Informação protegida	101	60.5	60.0	20
	RTq-ScCCR1N1 R	Informação protegida	101	60.1	45.0	20
CCR2	RTq-ScCCR2 F	Informação protegida	138	59.5	45.0	20
	RTq-ScCCR2 R	Informação protegida	138	59.0	50.0	20
CCR3	RTq-ScCCR3 F	Informação protegida	148	59.2	55.0	20
	RTq-ScCCR3 R	Informação protegida	148	59.3	45.0	20
HCT1	RTq-ScHCT1 F	Informação protegida	131	59.6	50.0	20
	RTq-ScHCT1 R	Informação protegida	131	60.6	50.0	20
HCT2	RTq-ScHCT2 F	Informação protegida	142	60.4	55.0	20
	RTq-ScHCT2 R	Informação protegida	142	59.9	60.0	20
HCT-L1	RTq-ScHCT-L1 F	Informação protegida	117	60.0	55.0	20
	RTq-ScHCT-L1 R	Informação protegida	117	60.3	50.0	20
HCT-L1	RTq-ScHCT-L1S F	Informação protegida	122	60.0	60.0	20
	RTq-ScHCT-L1S R	Informação protegida	122	59.5	55.0	20
COMT1	RTq-ScCOMT1 F	Informação protegida	147	59.4	55.0	20
	RTq-ScCOMT1 R	Informação protegida	147	59.2	45.0	20
COMT2	RTq-ScCOMT2 F	Informação protegida	107	60.0	61.1	18
	RTq-ScCOMT2 R	Informação protegida	107	60.3	45.0	20
CCoAMT1.1	RTq-ScCCoAOMT1.1 F	Informação protegida	102	58.9	47.4	19
	RTq-ScCCoAOMT1.1 R	Informação protegida	102	59.8	50.0	20
CCoAMT1.2	RTq-ScCCoAOMT1.2 F	Informação protegida	124	60.5	45.0	20
	RTq-ScCCoAOMT1.2 R	Informação protegida	124	60.9	45.0	20
CCoAMT1.2	RTq-ScCCoAOMT1.2N F	Informação protegida	143	59.5	45.0	20
	RTq-ScCCoAOMT12N R	Informação protegida	143	59.5	50.0	20

(Continua)

(Continuação)

CCoAMT2.1	RTq-ScCCoAOMT2.1 F	Informação protegida	142	59.6	66.7	18
	RTq-ScCCoAOMT2.1 R	Informação protegida	142	60.4	52.4	21
CCoAMT2.2	RTq-ScCCoAOMT2.2 F	Informação protegida	125	58.7	61.1	18
	RTq-ScCCoAOMT2.2 R	Informação protegida	125	57.8	50.0	20
CCoAMT2.3	RTq-ScCCoAOMT2.3 F	Informação protegida	86	59.8	55.0	20
	RTq-ScCCoAOMT2.3 R	Informação protegida	86	57.1	50.0	20
CCoAMT3	RTq-ScCCoAOMT3 F	Informação protegida	116	60.2	55.6	18
	RTq-ScCCoAOMT3 R	Informação protegida	116	60.2	50.0	20
C3H1	RTq-ScC3H1 F	Informação protegida	115	60.0	50.0	20
	RTq-ScC3H1 R	Informação protegida	115	61.1	45.0	20
C3H2	RTq-ScC3H2 F	Informação protegida	100	60.7	60.0	20
	RTq-ScC3H2 R	Informação protegida	100	60.3	45.0	20
C4H1	RTq-ScC4H1 F	Informação protegida	115	59.5	55.0	20
	RTq-ScC4H1 R	Informação protegida	115	59.5	45.0	20
C4H2	RTq-ScC4H2 F	Informação protegida	109	60.1	55.0	20
	RTq-ScC4H2 R	Informação protegida	109	59.9	40.0	20
C4H2	RTq-ScC4H2N1 F	Informação protegida	87	60.1	55.0	20
	RTq-ScC4H2N1 R	Informação protegida	87	60.5	55.0	20
C4H3	RTq-ScC4H3 F	Informação protegida	103	59.6	55.0	20
	RTq-ScC4H3 R	Informação protegida	103	59.0	55.6	18
F5H1	RTq-ScF5H1 F	Informação protegida	106	59.4	55.0	20
	RTq-ScF5H1 R	Informação protegida	106	60.3	45.0	20
F5H2	RTq-ScF5H2 F	Informação protegida	121	60.7	55.0	20
	RTq-ScF5H2 R	Informação protegida	121	60.0	50.0	20
F5H2	RTq-ScF5H2N1 F	Informação protegida	113	60.1	50.0	20
	RTq-ScF5H2N1 R	Informação protegida	113	60.0	50.0	20
F5H2	RTq-ScF5H2NS2 F	Informação protegida	114	60.1	50.0	20
	RTq-ScF5H2NS2 R	Informação protegida	114	60.1	50.0	20
F5H2	RTq-ScF5H2N2 F	Informação protegida	111	59.9	55.0	20
	RTq-ScF5H2N2 R	Informação protegida	111	60.0	55.0	20
CSE1	RTq-ScCSE1 F	Informação protegida	89	60.5	57.9	19
	RTq-ScCSE1 R	Informação protegida	89	60.2	50.0	20
CSE2	RTq-ScCSE2 F	Informação protegida	96	60.2	50.0	20

(Continua)

(Conclusão)

	RTq-ScCSE2 R	Informação protegida	96	60.3	57.9	20
CSE2	RTq-ScCSE2N1 F	Informação protegida	94	59.4	55.0	20
	RTq-ScCSE2N1 R	Informação protegida	94	60.7	50.0	20
CSE2	RTq-ScCSE2N2 F	Informação protegida	124	60.2	55.0	20
	RTq-ScCSE2N2 R	Informação protegida	124	60.5	60.0	20
CSE2	RTq-ScCSE2N3 F	Informação protegida	126	59.6	63.2	19
	RTq-ScCSE2N3 R	Informação protegida	126	60.0	55.0	20
CSE1	RTq-ScCSE1S F	Informação protegida	131	60.2	57.9	19
	RTq-ScCSE1S R	Informação protegida	131	60.3	57.9	19
CSE1	RTq-ScCSE1SN1 F	Informação protegida	128	59.9	55.0	20
	RTq-ScCSE1SN1 R	Informação protegida	128	59.9	45.0	20

Produto : tamanho do fragmento gerado; Tm: temperatura de *melting* (anelamento); GC: conteúdo citosina/guanina; Length: tamanho das bases do *primer*.
Fonte: Autoria própria

ANEXO C – TABELA DE RESULTADO DA PADRONIZAÇÃO DOS *PRIMERS*

Tabela C1 – Lista da padronização dos *primers*. Tabela mostra concentração do primer e diluição da amostra determinada experimentalmente como ideal para obtenção da maior eficiência da RT-PCR. O símbolo * significa *primers* que não obtiveram resultados positivos durante os testes de padronização nas amostras estudadas.

Gene	Nome	Concentração primer	Diluição amostra
PAL1.1	RTq-ScPAL1.1 F	200	1:50
	RTq-ScPAL1.1 R		
PAL1.2	RTq-ScPAL1.2 F	200	1:50
	RTq-ScPAL1.2 R		
PAL2	RTq-ScPAL2 F	*	*
	RTq-ScPAL2 R		
PAL2	RTq-ScPAL2N1 F	400	1:50
	RTq-ScPAL2N1 R		
4CL1	RTq-Sc4CL1 F	200	1:50
	RTq-Sc4CL1 R		
4CL2	RTq-Sc4CL2 F	400	1:50
	RTq-Sc4CL2 R		
4CL3	RTq-Sc4CL3 F	200	1:50
	RTq-Sc4CL3 R		
4CL4	RTq-Sc4CL4 F	400	1:50
	RTq-Sc4CL4 R		
4CL5	RTq-Sc4CL5 F	200	1:50
	RTq-Sc4CL5 R		
CAD2	RTq-ScCAD2 F	*	*
	RTq-ScCAD2 R	*	*
CAD2	RTq-ScCAD2N2 F	600	1:25
	RTq-ScCAD2N2 R		
CAD2	RTq-ScCAD2N3 F	*	*
	RTq-ScCAD2N3 R		
CAD2	RTq-ScCAD2N1 F	*	*
	RTq-ScCAD2N1 R		
CAD6	RTq-ScCAD6 F	600	1:25
	RTq-ScCAD6 R		
CAD7	RTq-ScCAD7 F	400	1:50
	RTq-ScCAD7 R		
CAD5	RTq-ScCAD5 F	200	1:50
	RTq-ScCAD5 R		

(Continua)

(Continuação)

CAD8	RTq-ScCAD8 F	*	*
	RTq-ScCAD8 R		
CAD8	RTq-ScCAD8N1 F	200	1:50
	RTq-ScCAD8N1 R		
CAD1	RTq-ScCAD1 F	200	1:50
	RTq-ScCAD1 R		
CCR1	RTq-ScCCR1 F	*	*
	RTq-ScCCR1 R		
CCR1	RTq-ScCCR1N1 F	400	1:50
	RTq-ScCCR1N1 R		
CCR2	RTq-ScCCR2 F	200	1:50
	RTq-ScCCR2 R		
CCR3	RTq-ScCCR3 F	200	1:50
	RTq-ScCCR3 R		
HCT1	RTq-ScHCT1 F	200	1:50
	RTq-ScHCT1 R		
HCT2	RTq-ScHCT2 F	200	1:50
	RTq-ScHCT2 R		
HCT-L1	RTq-ScHCT-L1 F	200	1:50
	RTq-ScHCT-L1 R		
HCT-L1	RTq-ScHCT-L1S F	*	*
	RTq-ScHCT-L1S R		
COMT1	RTq-ScCOMT1 F	200	1:50
	RTq-ScCOMT1 R		
COMT2	RTq-ScCOMT2 F	400	1:50
	RTq-ScCOMT2 R		
CCoAMT1.1	RTq-ScCCoAOMT1.1 F	200	1:50
	RTq-ScCCoAOMT1.1 R		
CCoAMT1.2	RTq-ScCCoAOMT1.2 F	400	1:50
	RTq-ScCCoAOMT1.2 R		
CCoAMT1.2	RTq-ScCCoAOMT1.2N F	*	*
	RTq-ScCCoAOMT1.2N R		
CCoAMT2.1	RTq-ScCCoAOMT2.1 F	600	1:25
	RTq-ScCCoAOMT2.1 R		
CCoAMT2.2	RTq-ScCCoAOMT2.2 F	*	*
	RTq-ScCCoAOMT2.2 R		
CCoAMT2.3	RTq-ScCCoAOMT2.3 F	600	1:50
	RTq-ScCCoAOMT2.3 R		
CCoAMT3	RTq-ScCCoAOMT3 F	*	*
	RTq-ScCCoAOMT3 R		
C3H1	RTq-ScC3H1 F	200	1:50

(Continua)

(Conclusão)

	RTq-ScC3H1 R		
C3H2	RTq-ScC3H2 F	200	1:50
	RTq-ScC3H2 R		
C4H1	RTq-ScC4H1 F	200	1:50
	RTq-ScC4H1 R		
C4H2	RTq-ScC4H2 F	*	*
	RTq-ScC4H2 R		
C4H2	RTq-ScC4H2N1 F	400	1:50
	RTq-ScC4H2N1 R		
C4H3	RTq-ScC4H3 F	200	1:50
	RTq-ScC4H3 R		
F5H1	RTq-ScF5H1 F	200	1:50
	RTq-ScF5H1 R		
F5H2	RTq-ScF5H2 F	*	*
	RTq-ScF5H2 R		
F5H2	RTq-ScF5H2N1 F	*	*
	RTq-ScF5H2N1 R		
F5H2	RTq-ScF5H2NS2 F	600	1:25
	RTq-ScF5H2NS2 R		
F5H2	RTq-ScF5H2N2 F	*	*
	RTq-ScF5H2N2 R		
CSE1	RTq-ScCSE1 F	400	1:50
	RTq-ScCSE1 R		
CSE2	RTq-ScCSE2 F	*	*
	RTq-ScCSE2 R		
CSE2	RTq-ScCSE2N1 F	*	*
	RTq-ScCSE2N1 R		
CSE2	RTq-ScCSE2N2 F	*	*
	RTq-ScCSE2N2 R		
CSE2	RTq-ScCSE2N3 F	*	*
	RTq-ScCSE2N3 R		
CSE1	RTq-ScCSE1S F	*	*
	RTq-ScCSE1S R		
CSE1	RTq-ScCSE1SN1 F	*	*
	RTq-ScCSE1SN1 R		

Fonte: Autoria própria