

Teor de Lignina em Plantas de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Tratadas com Fitorreguladores

Maria Beatriz de Oliveira*, Heber dos Santos Abreu e Regina Paula Willemen Pereira***

*Mestre em Ciências Ambientais e Florestais, Engenheira Florestal

**Professor Adjunto

Departamento de Produtos Florestais, Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7. Seropédica - Rio de Janeiro, CEP 23890-000, BRAZIL

Sumário. Lignina é uma biomacromolécula indispensável a diversos processos biológicos das plantas, dos quais o mais importante é conferir rigidez necessária à manutenção da verticalidade do caule e principalmente assegurar a existência de vias rápidas de circulação da água e minerais. Esta pesquisa foi realizada com plantas de *Eucalyptus urophylla* e os resultados podem viabilizar outros estudos na área da biotecnologia. Nesta pesquisa foram aplicadas diferentes concentrações de reguladores de crescimento [ácido jasmônico (1µM e 2 µM) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (18,12 µM e 36,24 µM)]. O experimento foi factorial completo com delineamento inteiramente casualizado. Os resultados mostraram que os tratamentos com o ácido jasmônico na sua primeira concentração activou o processo de formação da lignina enquanto a segunda concentração desactivou o processo de lignificação. No tratamento com 2,4-D (A1- 18,12 µM) o processo de lignificação contribuiu para reduzir a deposição de lignina, enquanto (A2 - 36,24 µM) teve uma redução menor comparado com a testemunha. Os tratamentos conjugados J1A1 (1µM de ácido jasmônico + e 18,12 µM de 2,4-D) e J1A2 (2µM de ácido jasmônico + e 36,24 µM de 2,4-D) apresentaram efeito sinérgico com predomínio do ácido jasmônico, sobre a biossíntese da lignina. Os resultados apontaram para modificação do processo de lignificação assim como na constituição proteica e nas características anatómicas.

Palavras-chaves: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ácido jasmônico; lignificação

Tenor of Lignin in Seedlings of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Treated with Phyto regulators

Abstract. Lignin is an indispensable biomacromolecule for various biological processes in plants. One of the most important lignin functions is to maintain the rigidity needed for the verticality of the main stem and to ensure the water and mineral movement. This research was carried out with seedlings of *Eucalyptus urophylla* and the results may facilitate further studies in biotechnology. In this research were applied different concentrations of plant growth regulators jasmonic acid (1 and 2 µM) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (18.12 and 36.24 µM)]. The experiment was full factorial with a completely randomized design. The results showed that the treatment with jasmonic acid in its first dosage enabled the process of lignin formation and in a second dosage disabled the process of lignification. In the treatment with

2,4-D (A1-18.12 μ M) the process of lignification contributed to reduce the deposition of lignin, while (A2 - 36.24 μ M) had a smaller reduction compared with the standard. The combined treatments J1A1 (1 μ M jasmonic acid and 18.12 μ M 2,4-D) and J1A2 (2 μ M jasmonic acid and 36.24 μ M 2,4-D) showed synergistic effect with a predominance of jasmonic acid on lignin formation. The results pointed out for change in the lignification process as well as protein and anatomical features.

Key words: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid; jasmonic acid; lignification

Teneur en Lignine de Plantes de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Traitées avec des Phytoregulateurs

Résumé. La lignine est une biomacromolécule indispensable à divers processus biologiques des végétaux, dont le plus important est de conférer de la rigidité nécessaire au maintien de la verticalité de la tige principale et d'assurer l'existence des voies rapides de circulation de l'eau et de minéraux. Cette recherche a été réalisée avec des jeunes plantes de *Eucalyptus urophylla* et les résultats peuvent viabiliser d'autres études dans le domaine de biotechnologie. Dans cette étude, différentes concentrations de régulateurs de croissance ont été appliquées [acide jasmonique ((1 μ M et 2 μ M) et acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (18,12 μ M et 36,24 μ M)]. Le dispositif expérimental a été le factoriel complet avec un design complètement aléatoire. Les résultats ont montré que les traitements avec l'acide jasmonique dans sa première concentration ont activé le processus de formation de la lignine pendant que la deuxième concentration a désactivé ce processus. Dans le traitement avec l'acide 2,4-D (A1- 18,12 μ M), le processus de lignification a contribué pour la réduction du dépôt de lignine, alors que (A2 - 36,24 μ M) a eu une réduction plus petite lorsque comparée avec le témoin. Les traitements combinés J1A1 (1 μ M d'acide jasmonique et 18,12 μ M de 2,4-D) et J1A2 (2 μ M d'acide jasmonique et 36,24 μ M de 2,4-D) ont présenté un effet synergique avec une prédominance de l'acide jasmonique sur la biosynthèse de la lignine. Les résultats indiquent une modification du processus de lignification ainsi que de la constitution des protéines et des caractéristiques anatomiques.

Mots clés: Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique; acide jasmonique; lignification

Introdução

A lignificação é um processo bioquímico que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores no compartimento citoplasmático. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reacção de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. Enzimas oxi-redutoras tais como peroxidases e isoenzimas correspondentes atuam na parede celular formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogénio. A Lacase entre outras oxidases também promove oxidação desidrogenativa dos lignóis na parede

celular (LEWIS e SARKANEN, 1998; WHETTEN *et al.*, 1998). A lignificação é um processo que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e polimerização na parede celular.

A sua arquitectura molecular difere segundo a origem botânica dos táxons, entre células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (LARROQUE e PLANCHON, 1990; KITAYAMA *et al.*, 2004). As plantas detêm mecanismos coordenados de deposição da lignina, assim sua síntese obedece aos conceitos da topoquímica onde o tempo e local de posição pode ser endógena e exogenamente afectado.

Os vegetais produzem moléculas

sinalizadoras, conhecidas como hormônios, e são responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento em concentrações bastante pequenas. Até há pouco tempo, acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por apenas cinco hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Entretanto, evidências atuais indicam a existência de outros hormônios vegetais incluindo ácido jasmônico, brassinosteróides, ácido salicílico, glicoxilanas e polipeptídios sistemina. O número e os tipos de hormônios, além dos agentes sinalizadores homólogos, continuam aumentando (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O ácido jasmônico, por exemplo, estimula o crescimento celular e promove mudanças genéticas que alteram a formação do xilema. Os jasmonatos são derivados pelo ácido jasmônico e seus-ésteres metil. Eles inibem muitos processos vegetais como crescimento e germinação de sementes, e também promovem senescência, abscisão, formação de tubérculo, amadurecimento de fruto, formação de pigmento e enrolamento de gavinha. Um importante papel na activação de enzimas associado ao sistema de lignificação das plantas (DAVIES, 1995).

As auxinas exercem papéis críticos nas respostas de crescimento, principalmente durante desenvolvimento da planta. Ao nível celular, a auxina age como um sinal para divisão, expansão, e diferenciação ao longo do ciclo de vida da planta. Tem um papel importante na formação da raiz, dominância apical e senescência (GODA *et al.*, 2004).

Na realidade, a busca de sistemas activadores da lignificação pode ser alcançada com a aplicação simples e conjugada de reguladores de crescimento

que têm efeito sobre xilogênese.

A fenilalanina, pela acção da enzima fenilalanina amoníasiase (PAL), perde uma molécula de amónia, originando o ácido cinâmico, que é um dos precursores da lignina na via biossintética. A regulação dessa enzima é um factor crítico na produção dos metabólitos da via dos fenilpropanóides. Nas plantas, a actividade da PAL está sob controle de vários factores internos e externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões (RHODES, 1994).

Material e métodos

Neste experimento foram utilizadas sementes certificadas de *Eucalyptus urophylla* adquiridas do IPEF/SP. Foi utilizado substrato (60% de composto orgânico, 20% de argila, 10% de areia e 10% de vermiculita) preparado em um Viveiro Florestal. Inicialmente foram plantadas em tubetes com capacidade de 53cm³, com adubações e tratos silviculturais para o crescimento de plantas saudias. Depois de três meses e meio foram transferidas para citrus 3800 (tubete) com capacidade de 3,8L e transferidos para Casa de Vegetação onde permaneceram até os seis meses.

As aplicações com os reguladores de crescimento, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido jasmônico (AJ) foram realizadas em Casa de Vegetação, com a 1ª aplicação, de acordo com o cronograma do experimento no campo. As aplicações continuaram sendo feitas de dez em dez dias, totalizando sete aplicações no horário de 05h00min as 07h00min, para uma melhor eficiência da absorção dos reguladores de crescimento aplicados sobre as folhas (Figura 1).



Figura 1 - Aplicação de AJ e 2,4-D em *Eucalyptus urophylla* na Casa de Vegetação

Essas soluções constituídas de AJ, 2,4-D, H₂O bideionizada e adesil. O adesil que é um tensoativo não iônico é um agente que não fornece íons em solução e cuja solubilidade em água se deve a presença, nas suas moléculas, de grupamentos funcionais possuindo forte afinidade pela água, ajudando assim na absorção pelas folhas da planta.

A lignina insolúvel foi quantificada pelo método de Klason. 300mg de amostra seca foram transferidas para um tubo de ensaio, adicionando-se 3mL de ácido sulfúrico 72%. A amostra foi macerada (mecanicamente) por agitação contínua durante 3 minutos no macerador mecânico de tecidos (Potters – B. Braun Biotech International). Depois foi mantida entre 25 a 30°C, usando-se banho maria, agitando-se frequentemente por uma hora. O material foi transferido para um balão de 250mL e

diluído à solução de ácido sulfúrico 72%, adicionando 84mL de água destilada. O material ficou em refluxo por 4h, sendo em seguida lavado com H₂O quente (500mL). A solução de lignina ácida foi filtrada em um funil de placa sinterizada e colocado em estufa a 105°C até peso constante. Por último, os filtros contendo as amostras foram pesados calculando-se a porcentagem de lignina na madeira, pela equação $\% \text{ lignina} = [\text{peso seco(mg)}/\text{peso da amostra em mg (300mg)}] \times 100$ (EFFLAND, 1977).

Resultados e discussão

As aplicações de ácido jasmônico (AJ) e o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) contribuíram para a mudança do teor de lignina no *Eucalyptus urophylla*. O AJ quando aplicado na sua menor concentração de 1 μM (J1) teve um

resultado relevante aumentando consideravelmente o teor de lignina para 41,56%, em relação à testemunha (H₂O) com 26,43%. Na concentração de 2 μ M (J2) ele teve um efeito inibitório, reduzindo a lignina para 20,49%, abaixo da H₂O (testemunha).

Os tratamentos envolvendo o 2,4-D tiveram efeitos diferentes entre si e em relação à H₂O (testemunha). Os tratamentos A1 (17,42%) e A2 (23,55%) tiveram diferença estatística ao nível de 5% de significância. Os tratamentos conjugados tiveram sinergismo. Pode-se observar que o J1 (41,56%) tem a maior concentração de lignina nos tratamentos simples (J1, J2, A1 e A2) e quando combinado com A1 e A2, mantiveram com o teor de lignina alto para J1A1 (41,08%) e J1A2 (42,45%). Isso demonstra que o ácido jasmônico na sua 1ª concentração (1 μ M) activou a via fenilpropanóides.

Quando o J2 foi combinado com o A1 e A2 prevaleceu o efeito do 2,4-D

diminuindo para 21,25% (J2A1) e aumentando para 27,51% (J2A2), este último ultrapassando a testemunha (H₂O). Sendo que o J2 (20,49%) teve um teor de lignina maior do que o A1 (17,43%). Como foi observado a 2ª concentração do AJ inibiu a formação da lignina, porém quando foi aplicado conjuntamente com o 2,4-D (J2A2) teve um aumento na produção deste metabólito secundário, sendo provavelmente com uma actuação maior do 2,4-D na sua 2ª concentração (A2), quando combinado com o J2 (Figura 2).

No nosso experimento percebemos que o 2,4-D, inibe a rota do fenilpropanóide diminuindo a presença de metabólitos secundários. Sendo constatado que a menor concentração utilizada do 2,4-D teve um maior efeito nesta rota diminuindo para 17,43% (A1). Quando aplicada à segunda concentração o efeito de diminuição foi menor (23,55% - A2).

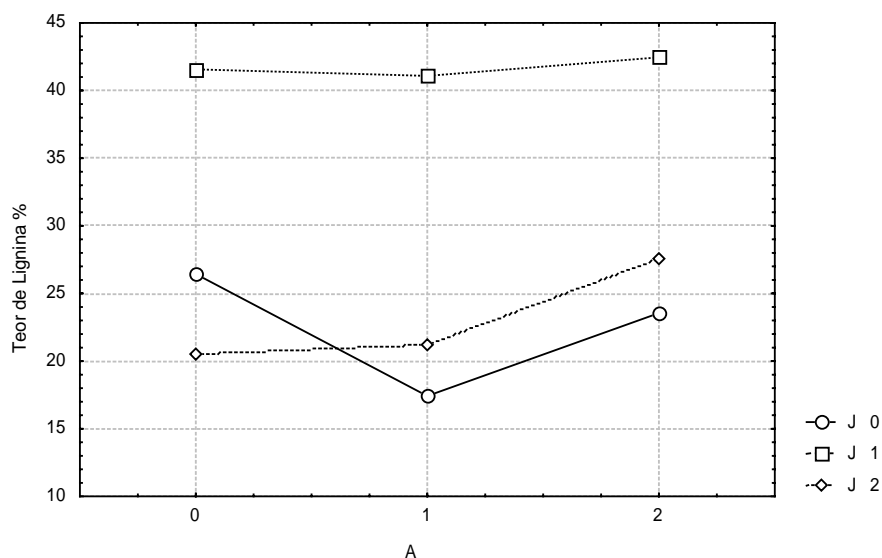


Figura 2 - Teor médio de lignina dos tratamentos do *Eucalyptus urophylla*

Segundo KAVALIER (2000) o ácido jasmónico é uma das moléculas sinalizadoras que inicia a activação da PAL (fenilalanina amónia-liase). A PAL é uma das enzimas da via fenilpropanóides, que é a rota biossintética da formação da lignina e outros metabólitos secundários. Este efeito do sinal do ácido jasmónico no aumento de activação e na concentração da PAL poderia aumentar a produção de metabólitos secundários, como foi estudado por KAVALIER (2000) com *Brassica rapa* tendo sido borrifado 2 µM de solução de cis e trans metil jasmonato em etanol, no qual teve um aumento de antocianina.

A fenilalanina, pela acção da enzima fenilalanina amónia-liase (PAL), perde uma molécula de amónia, originando o ácido cinâmico, que é um dos precursores da lignina na via biossintética. A regulação dessa enzima é um factor crítico na produção dos metabólitos da via dos fenilpropanóides. Nas plantas, a actividade da PAL está sob controle de vários factores internos e externos, tais como hormónios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões (RHODES, 1994).

Conclusões

- O ácido jasmónico na concentração de 1 µm (J1) aumentou de forma significativa o teor de lignina, activando o processo de formação da mesma; isso provavelmente deve-se a activação principalmente da PAL durante a formação da lignina;

- Quando aplicado na sua segunda concentração 2 µm (J2) ele teve um efeito inibitório no processo de formação da lignina, resposta definida pela concentração para inibição da

lignificação;

- Os tratamentos com 2,4-D (A1 e A2) tiveram uma resposta com teor de lignina reduzida; isto mostra que apesar da sua importância na eficiência na modulação da célula, nesta concentração apenas diminui a taxa de lignificação;

- Os tratamentos conjugados tiveram respostas diferentes, nos que tiveram a presença da primeira concentração de AJ, o J1, a formação da lignina foi activada, J1A1 e o J1A2. Quando conjugado o 2,4-D com a segunda concentração do AJ, o J2A1 ficou com teor de lignina abaixo da testemunha (H₂O) e o J2A2 com o teor acima da testemunha.

Agradecimentos

Os autores agradecem á CAPES pelo apoio financeiro.

Bibliografia

- DAVIES, P.J., 1995. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: DAVIES, P.J. (Ed.) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2.ed. Estados Unidos, Kluwer Academic Publishers, Cap.1, pp. 1-12.
- EFFLAND, M.J., 1977. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi* **60**(10): 143-144.
- GODA, H., SAWA, S., ASAMI T., FUJIOKA S., SHIMADA, Y., YOSHIDA, S., 2004. Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated and Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. *Plant Physiology Preview* **10**: 1104-1110.
- KAVALIER, A., 2000. The effects of methyl jasmonate on the anthocyanin content and growth rates of the Wisconsin fast plants *Brassica rapa*. Research performed at the College of Charleston.

- KYTAYAMA, K., SUZUKI, S., HORI, M., TAKYU, M., AIBA, S.I., MALAJALAP-LEE, N., KIKUZAWA, K. 2004. On the relationships between leaf-litter lignin and net primary productivity in tropical rain forests. *Oecologia* **40**: 335-339.
- LARROQUE, C.M., PLANCHON C.L., 1990. Lignification and physiological factors of yield in maize. *Published in Crop Sci.* **30**: 1105-1109.
- LEWIS, N.G., SARKANEN, S., 1998. *Lignin and lignan biosynthesis*, American Chemical Society. Washington, DC, 436 pp.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed., Porto Alegre, Artmed, 719 pp..
- WHETTEN, R.W., MACKAY, J.J., SEDEROFF, R.R., 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology* **49**: 585-609.

Entregue para publicação em Agosto de 2008

Aceite para publicação em Outubro de 2008