

Fluorescência da lignina da madeira de eucalipto submetido a estresse hídrico

Jordão Cabral Moulin¹; Josy Tainara Silva Silva¹; Vaniele Bento dos Santos¹; Nauan Ribeiro Marques Cirilo²; Maria Naruna Felix de Almeida³; Graziela Baptista Vidaurre¹

¹Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro/ES, Brasil; ²Eldorado Brasil, Três Lagoas/MS, Brasil; ³Universidade do Estado do Pará, Paragominas/PA – vanielebento@hotmail.com

Resumo: O estudo da lignina a nível celular é realizado por diferentes técnicas microscópicas, podendo citar a técnica de fluorescência. Este trabalho teve como objetivo utilizar o método convencional de bancada (klason) e de fluorescência para investigar o efeito do estresse hídrico na quantificação da lignina da madeira do clone *E. urophylla*. Proveniente da região Mogi Guaçu, de clima úmido, e da região Bocaiúva, de clima seco, as árvores com 6 anos de idade passaram por tratamentos de disponibilidade de água. A análise da lignina pelo método de fluorescência e pelo método convencional, revelou que os indivíduos submetidos ao tratamento de exclusão de chuva apresentaram um aumento na lignificação, em comparação com os indivíduos que receberam água regularmente. Ambos métodos apresentaram tendência semelhante, isto reforça que a análise de fluorescência é uma técnica pertinente para análise da lignina principalmente para estudos a nível celular.

Palavras-chave: Agentes cromóforos; *E. urophylla*; Lignificação; Técnicas microscópicas.

Fluorescence of lignin from eucalyptus wood subjected to water stress

Abstract: The study of lignin at the cellular level is performed using different microscopic techniques, including the fluorescence technique. This study aimed to use the conventional bench method (Klason) and fluorescence to investigate the effect of water stress on the quantification of lignin in the wood of the clone *E. urophylla*. Originating from the Mogi Guaçu region, with a humid climate, and the Bocaiúva region, with a dry climate, the 6-year-old trees underwent water availability treatments. The analysis of lignin by the fluorescence method and the conventional method revealed that individuals subjected to the rain exclusion treatment showed an increase in lignification, compared to individuals that received regular water. Both methods showed similar trends, which reinforces that fluorescence analysis is a relevant technique for lignin analysis, especially for studies at the cellular level.

Keywords: Chromophore agents; *E. urophylla*; Lignification; Microscopic techniques.

1. INTRODUÇÃO

A lignina é um polímero não-polissacarídico, constituído de unidades derivadas do fenilpropano (Costa, 2012). A lignina incorpora a matriz polissacarídica como uma substância incrustante que cimenta e ancora as fibrilas de celulose, conferindo rigidez e coesão ao tecido da madeira como um todo (Plomion *et al.*, 2001), contribuindo para a resistência mecânica. Além disso, fornece também a superfície hidrofóbica que permite às plantas transportar água (Carder, 1995), e as suas propriedades físicas e químicas contribuem como barreira contra a invasão de pragas e patógenos (Bhuiyan *et al.*, 2009).

O conteúdo de lignina e a sua composição variam amplamente entre diferentes táxons, indivíduos, tecidos, tipos de células e camadas da parede celular (Plomion *et al.*, 2001). As folhosas possuem uma mistura de lignina com unidades de Siringil (S) e Guaiacil (G), e é caracterizada pela proporção (relação S/G) de subunidades (Novaes *et al.*, 2010). Em quantidade, a lignina é o terceiro maior componente estrutura da madeira (25-35%). A distribuição do conteúdo de lignina é diferente para cada região da célula, a maior concentração da lignina está localizada na região da lamela média, enquanto que a quantidade na parede celular das células é maior (Raven *et al.*, 2001).

O estudo da lignina a nível celular pode ser realizado por diferentes técnicas microscópicas. Análises químicas da madeira tradicionais, com ênfase na determinação de lignina, apresentam desafios relacionados principalmente ao custo e a execução. Os reagentes utilizados nesse tipo de análise apresentam alto custo, contribuindo para o aumento das despesas totais do processo. Além disso, os métodos analíticos empregados são complexos e demandam tempo para serem executados com precisão, dado que a primeira etapa dessa análise é a remoção dos extrativos totais, análise esta que demanda tempo e custo adicional.

Uma metodologia mais recente que pode ser utilizada é a técnica de fluorescência, que permite além da análise quantitativa, a análise geográfica de distribuição da lignina no tecido lenhoso. Isto é possível devido a autofluorescência gerada pelos agentes cromóforos presentes em sua estrutura (Liu *et al.*, 2004).

O teor de lignina na madeira muda continuamente, dependendo das variações climáticas e do estado fisiológico da planta (Almeida *et al.*, 2022). A autofluorescência da lignina pode ser usada para revelar sua presença em tecidos

vegetais (De Micco e Aronne, 2007; Donaldson e Radotic, 2013). Estudos revelaram que vários estresses abióticos enfrentados pelas plantas têm impacto sobre o conteúdo de lignina, afetando a biossíntese e a deposição de unidades de lignina na parede celular, estabelecendo assim um mecanismo de proteção das plantas contra seus efeitos adversos (Bhardwaj *et al.*, 2014).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo utilizar o método convencional de bancada (Klason) e de fluorescência para investigar o efeito do estresse hídrico na quantificação da lignina da madeira do clone *Eucalyptus urophylla*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção do material

Um clone de *Eucalyptus urophylla* com seis anos de idade e sob o espaçamento 3 x 3 m foi utilizado, proveniente de dois locais de plantios experimentais do projeto “TECHS” (Binkley *et al.*, 2017) no espaço temporal (2012-2018). A primeira região foi Mogi Guaçu com temperatura média de 22 °C, precipitação de 1.418 mm e 269 mm de déficits hídricos. A segunda região foi Bocaiúva, com temperatura média de 24 °C, precipitação de 1158 mm e 741 mm de déficits hídricos. Com isso Mogi Guaçu foi considerada a região de clima úmido e Bocaiúva a região de clima seco.

As árvores plantadas nas regiões de clima úmido e seco também passaram por tratamentos de disponibilidade de água. Os tratamentos foram: W = 100% de água, considerando a precipitação local, e WE = exclusão de 33% da chuva. Cada parcela tinha dimensões de 24 x 45 m, sendo que as parcelas WE estavam equipadas com calhas de polietileno de 0,5 m de largura, dispostas nas entrelinhas do plantio. As calhas foram instaladas um ano após o plantio (em 2013) e cobriam a superfície abaixo do dossel, em uma inclinação de 1 m de altura. A fertilização e o controle fitossanitário químico foram realizados durante o primeiro ano, conforme a necessidade específica de cada local.

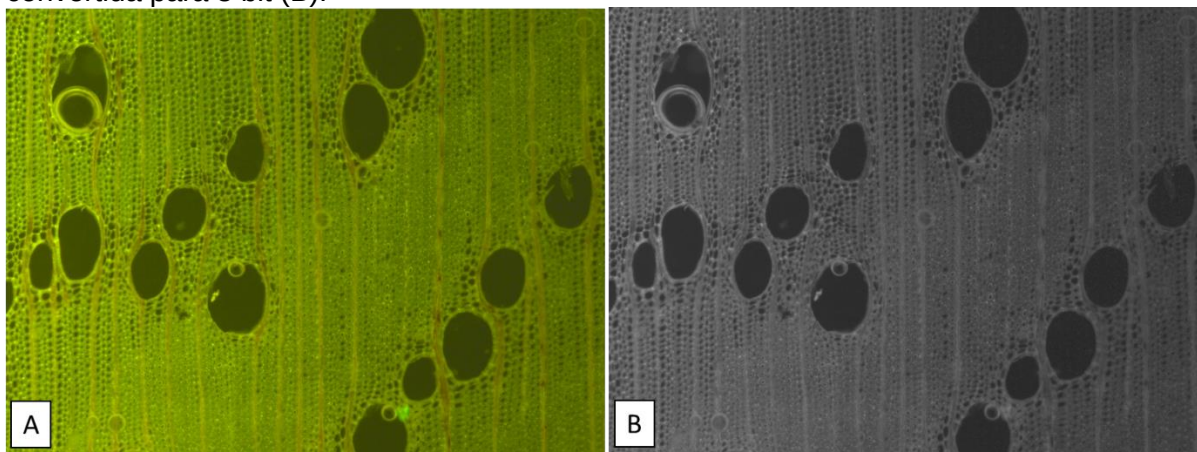
Para cada sítio e condição de disponibilidade de água, foram utilizadas 5 árvores, das quais foram retirados discos do DAP (diâmetro na altura do peito) para a preparação de blocos de madeira com dimensões de 10 x 5 x 20 mm (R x T x L) adjacentes ao câmbio (Yahya *et al.*, 2011). De cada corpo-de-prova, foram feitas 20

lâminas histológicas temporárias com espessura média de 20 µm, utilizando um micrótomo de deslize.

2.2 Fluorescência da lignina

As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de fluorescência da marca Zeiss e modelo Axio Scope A1, com aproximação de 100×, sendo realizada a excitação de 560 nm e detectadas em 600-650 nm (Ursache *et al.*, 2018). As imagens foram capturadas e processadas no *software* ImageJ para quantificação da intensidade da fluorescência. Na Figura 1 é possível visualizar a imagem do plano transversal do eucalipto sob fluorescência (Figura 1A).

Figura 1. Fotografia do plano transversal do eucalipto sob fluorescência (A), e fotografia convertida para 8 bit (B).



A região capturada para medição da fluorescência possui área de 278 × 208 µm e com resolução 2584 × 1936 pixels. A imagem então é convertida para 8 bit (Figura 1B) no programa ImageJ para a medição da intensidade da fluorescência feita através da fórmula adaptada de Fernando *et al.* (2015): Intensidade de Fluorescência = densidade integrada – (Área selecionada x intensidade do background). A mensuração da fluorescência foi realizada em 20 micrografias na lâmina histológica de cada condição de plantio.

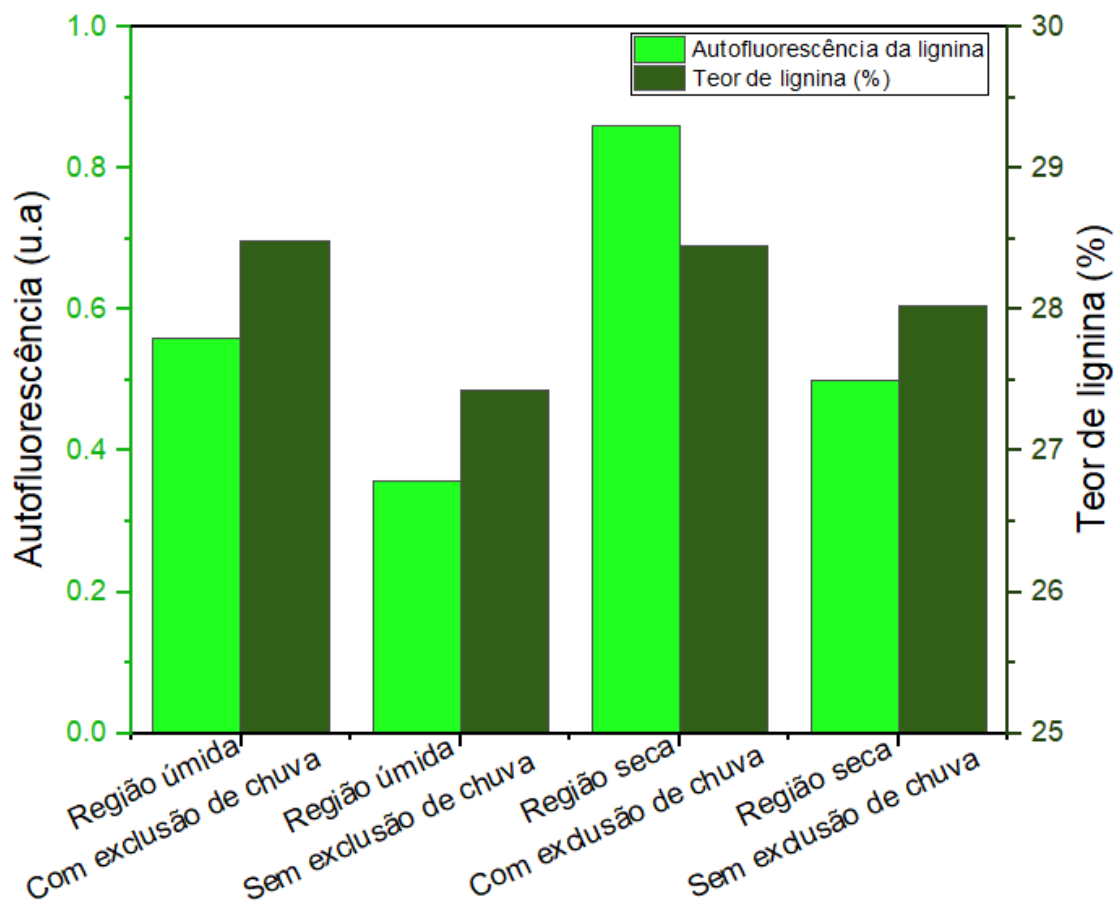
2.3 Teor de lignina da madeira

Os blocos de madeiras usados para a produção das lâminas histológicas foram triturados em moinho de facas do tipo Willey, para representar o mesmo lenho utilizado na análise de fluorescência. A análise de teor de lignina foi do tipo Klason, determinada conforme a norma TAPPI T 222 om-22 (2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da lignina pelo método de fluorescência e pelo método convencional, nas árvores plantadas tanto na região de Mogi Guaçu (clima úmido), como em Bocaiúva (clima seco), revelou que os indivíduos submetidos ao tratamento de exclusão de chuva apresentaram um aumento na lignificação, em comparação com os indivíduos que receberam água regularmente (Figura 2).

Figura 2. Lignina da madeira de eucalipto pelo método de fluorescência e pelo método convencional.



Ao comparar a quantificação de lignina pelo método de fluorescência e método convencional de bancada resultados promissores podem ser observados, uma vez que ambos apresentaram tendência semelhante. Isto reforça que a análise de fluorescência é uma técnica pertinente para análise da lignina principalmente para estudos a nível celular.

O eucalipto que cresceu em ambiente com maior seca apresentou maior teor de lignina, isto pode ser uma técnica de aclimação da espécie. As árvores que crescem sob estresse, como o hídrico, podem gerar ligninas com diferentes características e quantidades em função metabólica secundários (Polle *et al.*, 1997).

A lignificação é um processo complexo que envolve vários substratos fenólicos e enzimas diferentes, pode ocorrer prematuramente para evitar danos à parede celular quando as plantas são expostas a déficit hídrico (Moura *et al.*, 2010). Mudança na qualidade e no conteúdo de lignina em *E. globulus* Labill e em híbridos *E. urolobulus* (*E. globulus* × *E. urograndis*) e *E. urograndis* (*E. urophylla* × *E. grandis*) sob estresse de seca foram determinadas por um experimento conduzido por Moura *et al.* (2011). Foi relatado que, em *E. urograndis* sob estresse por seca, houve aumento na quantidade de lignina na região basal, enquanto no *E. globulus* houve um aumento na quantidade de lignina na região apical e nenhuma alteração foi observada na região basal. O *E. urolobulus* também apresentou um aumento no conteúdo de lignina na região apical e não foi observada nenhuma alteração significativa na região basal.

4. CONCLUSÃO

Pode concluir-se com os resultados deste trabalho que:

- Foi possível avaliar o conteúdo de lignina da madeira nos diferentes locais de acordo com a intensidade da reação de fluorescência.
- Ambos os métodos mostraram aumento na lignificação dos indivíduos submetidos ao estresse hídrico.
- O método de fluorescência apresentou resultado semelhante ao método convencional para indicar o comportamento da lignina presente no tecido lenhoso a nível celular.

- Para futuros trabalhos, análises com uma maior amplitude de teores de ligninas em diferentes amostras podem ser avaliadas de modo a se obter equações que relacionem essas metodologias de quantificação.

1. AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

2. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. N. F.; VIDAURRE, G. B.; LOUZADA, J. L. P. C.; *et al.* Differences in wood anatomy and chemistry of a *Eucalyptus urophylla* clone explained by site climate conditions. **Canadian Journal of Forest Research** 52: 834-844. 2022.

BHARDWAJ, R.; HANDA, N.; SHARMA, R.; *et al.* Lignins and Abiotic Stress: An Overview. P. Ahmad and M.R. Wani (eds.), Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies. **in** Plants Under Changing Environment, v. 1, 2014.

BHUIYAN, N. H.; SELVARAJ, G.; WEI Y.; *et al.* Papel da lignificação na defesa das plantas. **Plant Signal Behav**, v. 4, p. 158–159, 2009.

BINKLEY, D.; CAMPOE, O. C.; ALVARES, C.; *et al.* The interactions of climate, spacing and genetics on clonal Eucalyptus plantations across Brazil and Uruguay. **Forest Ecology and Management**. v. 405, p. 271-283, 2017.

CARDER, A. **Gigantes da Floresta do Mundo: Passado e Presente**. Fitzhenry e Whiteside, Markham, Canadá, 1995.

COSTA, Thales Henrique de Freitas. **Avaliação da recalcitrância de diferentes regiões oriundas de entrenós de cana-de-açúcar em híbridos com teores variados de lignina**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

DE MICCO, V.; ARONNE, G. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. **Biotechnic & Histochemistry**. v. 82, p. 209-216, 2007.

DONALDSON, L. A.; RADOTIC, K. Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. **J Microsc-Oxford**. v. 251, p. 178-187, 2013.

FERNANDO, C.; AUDIBERT, A.; SIMON, F.; *et al.* A role for the serine/arginine-rich (SR) protein B52/SRSF6 in cell growth and Myc expression in Drosophila. **Genetics**. v. 199, p. 1201–1211, 2015.

LIU, Y. X. e ZHAO, G. J. Wood Resource Material Science, **Chinese Forestry Press**, Beijing, China, 2004.

MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; OLIVEIRA, F. V. J.; DORNELAS, M.C.; MAZZAFERA, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 360–376, 2010.

MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; VIANA J. O. F.; DORNELAS, M. C.; MAZZAFERA, P. Drought stress and changes in the lignin content and composition in *Eucalyptus*. **BMC Proc** 5(suppl 7):P103. 2011.

NOVAES, E.; KIRST, M.; CHIANG, V.; WINTER-SEDEROFF, H.; SEDEROFF, R. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 555-561. 2010.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees Wood Formation in Trees. **Plant physiology**, v. 127, n. December, p. 1513.1523. 2001.

POLLE, A.; OTTER, T.; SANDERMANN, H. JR. Biochemistry and physiology of lignin synthesis (Bioquímica e fisiologia da síntese de lignina). **In:** Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds) *Trees-contributions to modern tree physiology*. Backhuys, Leiden, 455-475. 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biology of plants*. New York: Worth Publ, 791 p. 2001.

TAPPI: Technical Association of the Pulp and Paper Industry. T 222 om-02. **Acid-insoluble lignin in wood and pulp**. 5p. 2002.

URSACHE, R.; ANDERSEN, T. G.; MARHAVÝ, P.; GELDNER, N. A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. **The Plant Journal**, 93(2), 399-412. 2018.

YAHYA, R.; KOZE, K.; SUGIYAMA, J. Fibre length in relation to the distance from vessels and contact with rays in *Acacia mangium*. **IAWA J.** 32: 341–350, 2011.