

Caracterização bioquímica de genótipos de sorgo quanto ao teor de lignina e análise molecular de rotas metabólicas visando à produção de etanol de segunda geração

Cynthia M. B. Damasceno¹, Rafael A. C. Parrella¹, Maria Lúcia P. Simeone¹, Robert E. Schaffert¹ e Jurandir V. Magalhães¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG-424, Km 45, CP 151, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970.
e-mail: cynthia@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: lignina, sorgo, biomassa, bioetanol, lignocelulose.

Introdução

Tem sido proposto que a biomassa lignocelulósica representa a melhor fonte alternativa para produção em larga escala de etanol de segunda geração, por ser renovável, geograficamente distribuída e relativamente favorável no que diz respeito à emissão de gases poluentes (SOMERVILLE, 2006, 2007). Dentre as espécies de plantas cultivadas, o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) apresenta grande potencial para se tornar uma cultura dedicada à produção de etanol de primeira e segunda geração. Dentre as características mais importantes estão alta produção de biomassa seca, adaptabilidade a climas tropicais e temperados, baixos requerimentos de água e fertilizantes em comparação a outras culturas, presença de sistemas de produção estabelecidos, além de grande diversidade genética e alta tolerância à seca e ao calor, em termos relativos (MURRAY et al., 2008). É estimado que cultivares de sorgo dedicadas à bioenergia tenham o potencial de produzir até 50 ton/ha de biomassa lignocelulósica seca por ano. Devido às características já descritas, outra grande vantagem de se utilizar o sorgo é a possibilidade de cultivá-lo em áreas marginais, onde não é possível plantar cana-de-açúcar, preenchendo um nicho bastante específico para a cultura, dentro do setor de produção de biocombustíveis.

A produção de biocombustíveis lignocelulósicos envolve produção e coleta de biomassa, depolimerização dos polissacarídeos da parede celular (celulose e hemicelulose) em açúcares simples e fermentáveis pelos processos de pré-tratamento e sacarificação, e conversão de açúcares simples em biocombustíveis através da fermentação. A produção em larga escala de etanol de segunda geração ainda apresenta importantes problemas técnicos que precisam ser resolvidos para tornar o processo economicamente viável (STICKLEN, 2008). Um dos principais problemas é que a celulose encontrada na parede da célula vegetal está predominantemente na forma cristalina, o que a faz recalcitrante à hidrólise. Este problema é intensificado pelo fato das microfibras de celulose estarem inseridas em uma matriz complexa que inclui pectina, hemicelulose, e lignina. A lignina pode afetar o processo de sacarificação da biomassa em açúcares fermentáveis de duas maneiras: ela pode adsorver irreversivelmente as enzimas hidrolíticas, bloqueando sua ação na celulose (PALONEN et al., 2004) e, por ser um composto polifenólico (hidrofóbico), pode também prevenir que a fibra celulósica se entumeça, o que diminui a área de superfície acessível às enzimas (MOONEY et al., 1998). Consequentemente, a composição e a estrutura da parede celular são pontos importantes no programa de melhoramento de culturas dedicadas à produção de biocombustíveis.

Devido a sua importância econômica, a lignina tem sido extensivamente estudada. Na década passada, pesquisadores foram capazes de manipular o conteúdo e a composição de lignina em uma variedade de plantas utilizando o melhoramento e a engenharia genética



(BOUDET et al., 2003; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002). Esses estudos resultaram em plantas transgênicas mais eficientes em produção de papel ou digestibilidade de forragens, além de proporcionar um melhor entendimento da via biossintética da lignina (BOUDET et al., 2003; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002). Mais recentemente, esforços têm sido feitos para a obtenção de materiais melhor adaptados aos processos envolvidos na produção de etanol através da manipulação dos genes relacionados à biossíntese das subunidades da lignina ou monolignóis (p-hidroxifenil, guaiacil e siringil) (DAUWE et al., 2007; CHEN; DIXON, 2007). Atualmente, há um consenso de que 10 enzimas são necessárias para a biossíntese dos monolignóis (EHLTING et al., 2005).

Este trabalho tem como objetivo principal auxiliar e aumentar a eficiência do programa de melhoramento de sorgo sacarino e lignocelulósico da Embrapa Milho e Sorgo, identificando e caracterizando bioquímica e molecularmente acessos que apresentem menores teores do composto lignina, visando à produção de etanol em larga escala. O teor de lignina, dentre outros componentes da parede celular, foram analisados em um painel geneticamente diverso de sorgo. Para alguns destes materiais, os níveis de expressão para alguns dos genes-chave na via de biossíntese da lignina foram investigados utilizando RT-PCR em tempo real por detecção SYBR Green. No futuro, correlações entre expressão gênica e o conteúdo de lignina poderão contribuir para o melhor entendimento da síntese da lignina. Isso possibilitará, por exemplo, a seleção assistida por marcadores moleculares e/ou a piramidação de alelos em locos distintos que apresentem efeitos aditivos no fenótipo com propriedades superiores para conversão da biomassa.

Material e Métodos

Painel de sorgo sacarino e lignocelulósico e análises agrônômica e bioquímica

O painel de trabalho de sorgo consistiu de acessos geneticamente diversos, oriundos da coleção núcleo do CIRAD, bem como de linhagens-elite dos programas de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo e do Banco de Germoplasma de Sorgo. Para a caracterização do conteúdo de lignina, 102 acessos foram plantados em campo, em condições de dias curtos: 50 correspondentes a sorgo tipo sacarino e 52 correspondentes ao tipo lignocelulósico. Após a maturidade do grão, as plantas foram coletadas para análise de suas características morfo-agronômicas relacionadas à quantidade e à qualidade da biomassa, tais como: tempo para florescimento, altura, peso de massa verde (PMV), peso de massa seca (PMS). Análise de composição centesimal também foi empregada a fim de caracterizar bioquimicamente a biomassa para lignina (Klason), Fibra Detergente Neutra (FDN) e Fibra Detergente Ácida (FDA). Para a análise dos níveis de expressão dos genes relacionados à biossíntese de lignina, 35 acessos foram utilizados e plantados em casa de vegetação (12 h de luz por dia, temperatura média de 25 °C). O efeito dos genótipos foi analisado por um teste de ANOVA com o teste Scott-Knott (1% de significância), utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2006).

Identificação das famílias gênicas relacionadas à via biossintética da lignina em sorgo e desenho de primers específicos

Os genes cujas proteínas codificam enzimas da via biossintética da lignina foram identificados em sorgo utilizando-se sequências homólogas correspondentes aos genes já identificados em milho, arroz e *Arabidopsis*, cuja função das correspondentes proteínas tenha sido associada ao processo de biossíntese da lignina na literatura. Utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), estas sequências homólogas foram comparadas à



sequência genômica de sorgo (<http://www.phytozome.net/sorghum>) e também aos bancos contendo sequências ESTs de sorgo como TGI (<http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=sorghum>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e GRAMENE (<http://www.gramene.org>) para a correta predição de introns/exons dos genes de interesse. A fim de analisar os níveis de expressão dos genes relacionados à via biossintética de lignina, primers específicos para os genes que codificam as enzimas shikimato hidroxicinamatoil transferase (HCT) e 4-hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3'H) foram desenhados com o programa 'Primer3 v.0.4.0' (<http://frodo.wi.mit.edu>), desenvolvido por Rozen e Skaletsky (2000). Para diferenciar entre a amplificação resultante do cDNA sintetizado ou DNA genômico residual, os pares de primers gene-específicos foram desenhados de forma que flanqueiem introns, sempre que possível, e possuam Tm semelhante, em torno de 60 °C.

Análise de expressão dos genes envolvidos na via biossintética da lignina via RT-PCR em tempo real com detecção SYBR Green

O RNA total foi extraído dos entrenós superiores (mais jovens) de plantas, aproximadamente 8 semanas após o plantio em casa de vegetação. Após extração do RNA total e tratamento com DNase I, a primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o kit 'High Capacity cDNA Reverse Transcription' (Applied Biosystems). Cada amostra de cDNA foi diluída 10 vezes antes de amplificação com primers específicos. A expressão gênica foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo em tempo real no equipamento ABI Prism 7500. As condições de amplificação foram testadas para cada par de primers. Para efeitos de normalização, a expressão endógena foi quantificada com o controle rRNA 18S utilizando-se os primers 18S-F: 5'-GGCTCGAAGACGATCAGATACC-3'; e 18S-R: 5'-TCGGCATCGTTTATGGTT-3', descritos por Yang et al. (2004). A quantificação dos cDNAs sintetizados foi feita pela método SYBR Green de detecção. As mudanças em fluorescência do SYBR Green I dye foram monitoradas em cada ciclo pelo programa do sistema ABI 5700 e o ciclo 'threshold' (C_T) para cada reação foi calculado. A abundância relativa de cada produto amplificado foi determinada baseada no valor C_T de cada reação.

Análise da concentração de lignina Klason e análise de composição centesimal

As análises foram feitas no Laboratório de Análises Químicas de Plantas (LAQP) da Embrapa Milho e Sorgo. Dez plantas escolhidas aleatoriamente por linha foram coletadas quando atingiram maturidade e em seguida foram secas em estufa a 37 °C por 2 semanas antes de serem moídas e passadas por uma peneira de 1 mm. Parte do material seco foi extraído em solução de etanol 80% (v/v) à temperatura de 60 °C em um banho sonificador por 30 min para a remoção dos açúcares solúveis e outros compostos orgânicos. A suspensão foi filtrada, lavada com solução de etanol 80% (v/v) a 60 °C, e seca em estufa a 50 °C. O material seco foi usado para determinar lignina Klason pelo método de Theander e Westerlund (1986) com modificações descritas por Hatfield et al. (1999).

Resultados e Discussão

Avaliação do painel diverso de sorgo para propriedades relacionadas à qualidade e à quantidade da biomassa

O painel de trabalho de sorgo foi definido em parceria com os pesquisadores envolvidos nos programas de melhoramento de sorgo e biologia molecular da unidade. Um total de 102 materiais geneticamente diversos foi selecionado para compor o painel, incluindo



linhagens-elite dos programas de melhoramento da Embrapa e do Banco de Germoplasma de Sorgo, bem como oriundos da coleção-núcleo do CIRAD. O painel foi implantado no campo em blocos casualizados (uma linha por parcela com 2 blocos), em condições de dias curtos. Após maturidade do grão, os materiais foram coletados e analisados quanto a características morfo-agronômicas de interesse para produção da biomassa. Análise de composição centesimal da planta inteira também foi feita a fim de se determinar o teor de lignina bem como outros parâmetros estimadores da composição da parede celular (FDA ou Fibra Detergente Ácida; FDN ou Fibra Detergente Neutra; celulose, hemicelulose, conteúdo celular, cinzas, dentre outros). As referidas análises se encontram na Tabela 1, a qual corresponde ao quadro de ANOVA para este experimento, com as variáveis monitoradas durante o mesmo.

Tabela 1: Quadro de ANOVA para análise de características morfo-agronômicas e bioquímicas relacionadas à produção e qualidade da biomassa (lignocelulose) avaliadas em um painel de 102 acessos de sorgo cultivados em campo sob condições de dias curtos. Flor: Florescimento (dias após plantio), Alt: altura (metros), PMV: peso de massa verde (ton/ha), PMS: peso de massa seca (ton/ha), FDN: fibra detergente neutra (% de massa seca), FDA: fibra detergente ácida (% de massa seca), Lig: lignina (% de massa seca), Hemic: hemicelulose (% de massa seca), Cel: Celulose (% de massa seca).

F.V.	G.L.	Q.M.								
		Flor	Alt	PMV	PMS	FDN	FDA	Lig	Hemic	Cel
Bloco	1	70,58	0,037	9800,38	1973,70	9,38	19,23	42,46	1,93	118,88
Genótipo	101	424,37**	0,65**	359455,58	28228,73 **	42,76 **	36,60**	3,25**	15,97**	32,82**
Resíduo	101	11,59	0,014	**	1056,88	12,88	9,54	1,89	7,88	6,11
				12459,04						
CV(%)		3,96	6,25	18,27	19,24	5,25	7,30	31,39	10,77	6,52
Média		85,86	1,91	19,32	5,34	68,32	42,26	4,38	26,05	37,88
Mínimo		59,0	0,75	2,86	1,00	53,57	29,96	2,10	18,10	26,25
Máximo		140,0	3,50	80,60	19,26	80,47	56,65	11,30	35,29	53,45

Resultados significativos a * 5% e ** 1% pelo teste de Scott-Knott.

Para a característica florescimento, verificou-se que houve grande variabilidade entre os genótipos, que floresceram entre 59 e 140 dias após o plantio, sendo a média de aproximadamente 86 dias. A correlação entre os blocos foi bastante alta e o coeficiente de variação (CV%) bastante baixo (3,96), indicando que a coleta dos dados foi satisfatória. Como o painel foi plantado em condições de dias curtos, materiais sensíveis ao fotoperíodo floresceram mais cedo, não sendo possível medir o seu verdadeiro potencial quanto à produção de biomassa. Ainda assim, alguns materiais sensíveis que floresceram em torno de 75 dias após o plantio apresentaram valores de massa seca em torno da média do painel, que foi de 5.342,9 Kg/ha (Figura 1). Será interessante verificar como estes materiais sensíveis se comportarão em termos da produção de biomassa em condições de dias longos.



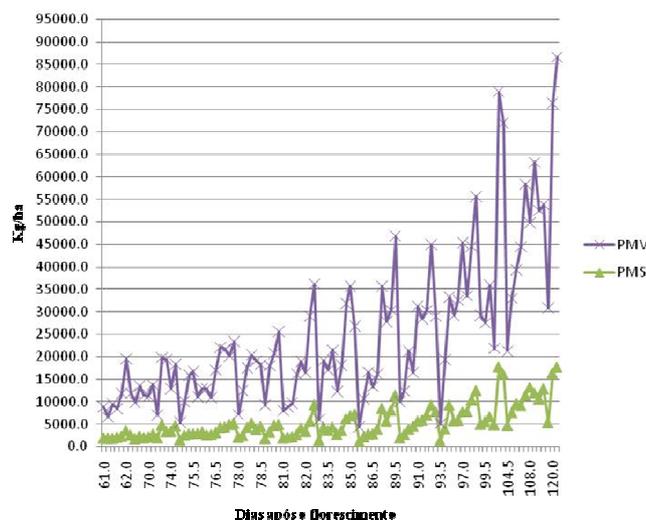


Figura 1: Comparação do tempo de florescimento (dias) e produção de peso de massa verde (PMV) e peso de massa seca (PMS).

Entre as características relacionadas à produção de biomassa (Peso de Massa Verde, PMV; Peso de Massa Seca, PMS; e altura) também houve grande variabilidade entre os genótipos. O PMV variou de 2,8 a 80,5 ton/ha, com média de 19,3 ton/ha, enquanto o PMS variou entre 1,0 e 19,2 ton/ha, sendo a média 5,3 ton/ha. A altura variou de 0,75 a 3,5 m, com média de 1,9 m. Enquanto o coeficiente de variação para altura foi baixo (6,2%), o CV% para PMS e PMV ficou entre 18 e 20%, o que ainda é aceitável para experimentos de campo.

O conteúdo de lignina variou entre 2,0 e 11,2 entre análises individuais e a média total foi de 5,85. Apesar desta característica ter apresentado um CV elevado, a Figura 2 demonstra a amplitude da variabilidade do teor de lignina presente em alguns materiais do painel analisado.

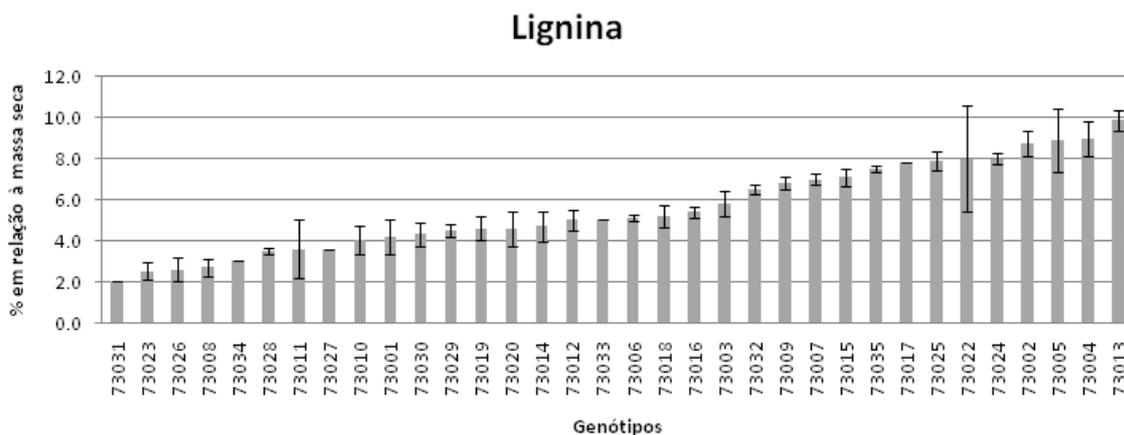


Figura 2: Análise do conteúdo de lignina Klason de 35 genótipos de sorgo expresso como % em relação à massa seca (médias de blocos com o respectivo desvio padrão).

Dentre os parâmetros bioquímicos avaliados, envolvidos com a qualidade da biomassa, os valores obtidos para FDN, FDA, hemicelulose e celulose estão expressos como % em relação à massa seca a 65 °C. Entre os genótipos, os teores variaram de 2,0 – 11, 2 para lignina, 53,6 – 80,5 para FDN, 29,9 – 56,7 para FDA, 18,1 – 35,3 para hemicelulose, e 26,2 - 53,4 para celulose. Nota-se que os valores de hemicelulose e celulose são apenas estimativas a partir das demais análises, portanto, devem ser avaliados de forma comparativa entre



genótipos. Como era de se esperar, análise de correlação simples confirmou que lignina possui alto índice de correlação positiva com FDN e FDA (coeficiente de correlação Pearson 0,70 para FDN e 0,89 para FDA), mas não com hemicelulose e celulose.

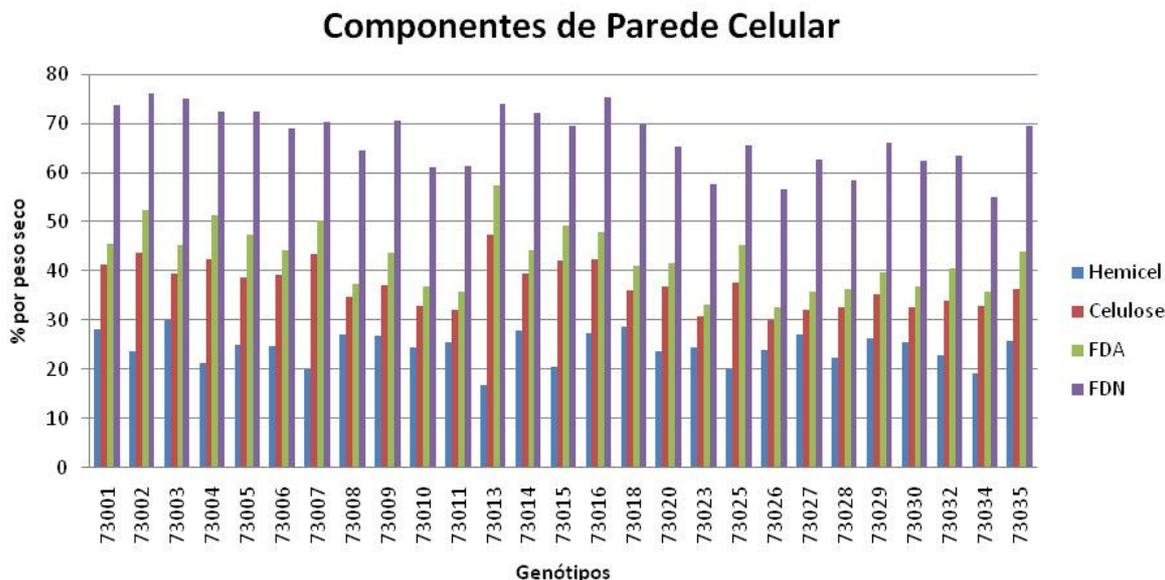


Figura 3: Análise de composição centesimal de 35 genótipos de sorgo com o conteúdo estimado dos valores médios para FDN (Fibra Detergente Neutra), FDA (Fibra Detergente Ácida), hemicelulose e celulose. Valores em porcentagem em relação ao peso seco da amostra (médias de 3 repetições com desvio padrão).

Apesar do alto CV obtido para análise de lignina Klason, os dados da Tabela 1 também confirmam que o painel estudado apresenta grande variabilidade fenotípica tanto para características morfo-agronômicas quanto bioquímicas, todas relacionadas com a produção e a qualidade da biomassa a ser obtida. Esses experimentos deverão ser repetidos sob condições de dias longos, para avaliar principalmente os genótipos sensíveis ao fotoperíodo e validar os resultados obtidos neste experimento. Os dados para lignina deverão ser mais bem estudados a fim de se decidir por um melhor método para sua determinação.

Identificação de genes, desenho de primers e análise da expressão gênica de genes relacionados à via biossintética da lignina em acessos do painel de sorgo utilizando-se a técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real.

A fim de melhor entender a síntese de lignina e identificar alvos moleculares para o programa de melhoramento de sorgo bioenergia, genes-chave envolvidos na via de biossíntese de lignina foram identificados por homologia de sequência em sorgo. Para estudar a expressão destes genes, a técnica de RT-PCR em tempo real foi utilizada em um subgrupo de 35 acessos do painel estudado, para análise de expressão gênica de 2 genes-chave na síntese de lignina: C3H e HCT. Os acessos utilizados na análise de expressão gênica foram plantados em casa de vegetação com 6 repetições por genótipo (2 vasos com 3 plantas cada). Amostras do entrenó superior (tecido mais jovem e menos lignificado, onde se espera maior expressão dos genes relacionados à biossíntese de lignina) foram coletadas para a extração de RNA após 8 semanas de plantio. A Figura 4 contém os resultados para os níveis de expressão gênica dos materiais analisados.



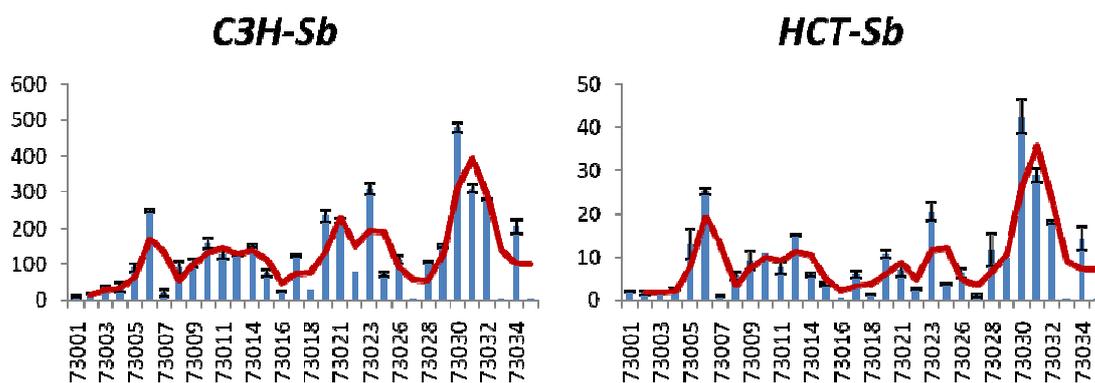


Figura 4: Análise de expressão gênica relativa (RQ) por PCR em tempo real para os genes da via de biossíntese de lignina C3H e HCT. RNA foi extraído de entrenós superiores de plantas crescidas em casa de vegetação por 8 semanas. A expressão gênica foi avaliada em um subgrupo de genótipos de sorgo contrastantes para o conteúdo de lignina utilizando PCR em tempo real por detecção SYBR Green (Barra de erros calculada a partir de três repetições). Linha de tendência demonstra correlação dos genes entre genótipos.

A Figura 4 sugere que os genes avaliados estão corregulados, uma vez que apresentaram expressão altamente correlacionada entre genótipos, além de apresentarem grande variabilidade de expressão entre os genótipos estudados. Estes genes estão no início da via biossintética da lignina e Chen e Dixon (2007) demonstraram que a regulação negativa destes genes foi mais eficaz em reduzir o teor de lignina em plantas de alfafa transgênicas para os mesmos, do que a regulação negativa de genes cujas proteínas atuam posteriormente na rota, demonstrando a importância deles para a síntese de lignina. Gachon et al. (2005) demonstraram que genes-chave da via biossintética dos fenilpropanóides, dentre eles alguns relacionados à síntese de lignina, também exibem expressão coordenada durante o desenvolvimento da planta, além de respostas a estresse.

Para se obter uma análise mais completa do processo, os mesmos materiais serão futuramente utilizados para a análise de expressão dos demais genes envolvidos na síntese de lignina, a fim de se correlacionar o conteúdo de lignina (e demais parâmetros bioquímicos investigados) e os níveis de expressão gênica. Os genes que demonstrarem expressão diferencial entre diferentes acessos, apresentando conteúdo de lignina contrastante, serão validados por análise de mapeamento por associação e selecionados para uso no programa de melhoramento de sorgo para bioenergia.

Conclusões

- O painel de sorgo geneticamente diverso apresentou grande variabilidade fenotípica para as características morfo-agronômicas e bioquímicas relacionadas à produção e à qualidade da biomassa, constituindo em excelente fonte de recursos genéticos para o programa de melhoramento de sorgo bioenergia.

- A análise de expressão dos genes C3H e HCT, envolvidos na síntese de lignina, sugere que estes genes são corregulados, e que houve variabilidade na expressão deles nos genótipos analisados.



Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 17, p. 389-402, 1997.

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 576-581, 2003.

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

CRUZ, C. D. **Programa Genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa, MG: UFV, 2006. v. 1, 175 p.

DAUWE, R.; MORREEL, K.; GOEMINNE, G.; GIELEN, B.; ROHDE, A.; VAN BEEUMEN, J.; RALPH, J.; BOUDET, A. M.; KOPKA, J.; ROCHANGE, S. F.; HALPIN, C.; MESSENS, E.; BOERJAN, W. Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. **Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 263-285, 2007.

EHLTING, J.; MATTHEUS, N.; AESCHLIMAN, D. S.; LI, E. Y.; HAMBERGER, B.; CULLIS, I. F.; ZHUANG, J.; KANEDA, M.; MANSFIELD, S. D.; SAMUELS, L.; RITLAND, K.; ELLIS, B. E.; BOHLMANN, J.; DOUGLAS, C. J. Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 618-640, 2005.

GACHON, C. M. M.; LANGLOIS-MEURINNE, M.; YVES, H.; SAINDRENAN, P. Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: functional and evolutionary implications. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, n. 2, p. 229-245, 2005.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 403-407, 1999.

HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 224-229, 2002.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, Essex, v. 64, p. 113-119, 1998.

MURRAY, S. C.; SHARMA, A.; ROONEY, W. L.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Genetic improvement of sorghum as a biofuel



feedstock: I. QTL for stem sugar and grain nonstructural carbohydrates. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 2165-2179, 2008.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, p. 65-72, 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

SOMERVILLE, C. The billion-ton biofuels vision. **Science**, Washington, v. 312, p. 1277, 2006.

SOMERVILLE, C. Biofuels. **Current Biology**, London, v. 17, p. R115-R119, 2007.

STICKLEN, M. A. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews-Genetics**, London, v. 9, p. 433-443, 2008.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, p. 330-336, 1986.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

YANG, W.; SCHEFFLER, B. E.; WESTON, L. A. *SOR1*, a gene associated with bioherbicide production in sorghum root hairs. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 55, p. 2251-2259, 2004.

Apoio: FAPEMIG

