



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

ISABELA DE MELO ACETO

**SUPEREXPRESSÃO DE GENE PARA A SÍNTESE DE POLIÓIS EM PLANTAS C4:
ALTERNATIVAS PARA AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DO ETANOL**

SANTO ANDRÉ

2023

ISABELA DE MELO ACETO

**SUPEREXPRESSÃO DE GENE PARA A SÍNTESE DE POLIÓIS EM PLANTAS C4:
ALTERNATIVAS PARA AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DO ETANOL**

Monografia apresentada ao Bacharelado em Biotecnologia, Pró-reitoria de Graduação da Universidade Federal do ABC - UFABC, como requisito para obtenção de título de Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo da Cruz Centeno.

Coorientadora: Dra. Karoline Estefani Duarte.

SANTO ANDRÉ

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Melo Aceto, Isabela
SUPEREXPRESSÃO DE GENES PARA A SÍNTESE DE
POLIÓIS EM PLANTAS C4 : ALTERNATIVAS PARA
AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DO ETANOL / Isabela de
Melo Aceto. — 2023.

48 fls. : il.

Orientador: Danilo da Cruz Centeno
Coorientadora: Karoline Estefani Duarte

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do
ABC, Bacharelado em Biotecnologia, Santo André, 2023.

1. Mio-inositol. 2. Biocombustíveis. 3. Melhoramento
genético. 4. *Setaria viridis*. 5. VTC4. I. da Cruz Centeno,
Danilo. II. Estefani Duarte, Karoline. III. Bacharelado em
Biotecnologia, 2023. IV. Título.

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso da aluna ISABELA DE MELO ACETO, realizada em 23 de Fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo da Cruz Centeno

Prof^a. Dra. Hana Paula Masuda

Me. Samuel Peres Chagas

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, familiares e amigos por estarem comigo durante todo o processo me apoiando e sendo minha fortaleza.

A todos os professores da UFABC que passaram pela minha graduação e me inspiraram, principalmente ao professor Danilo Centeno, por ter me orientado nesta jornada e ao professor Gustavo Dalpian, por sempre acreditar no meu melhor.

Agradecimentos especiais à Karoline, por ter tido paciência com todas as minhas dúvidas e ter me guiado durante todo o desenvolvimento deste trabalho, sendo uma grande parceira e mentora.

À todos os colegas de laboratório por me acompanharem e ajudarem sempre que necessário.

Ao Programa de Recursos Humanos da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do ABC por ter sido um espaço de aprendizado e crescimento durante todos esses anos e a todos seus servidores e terceirizados por manterem o funcionamento da universidade durante todas as adversidades, por maiores que fossem.

RESUMO

A diversificação da matriz energética visando a redução de emissões de gases de efeito estufa (GEE) através da substituição dos combustíveis fósseis é um objetivo mundial. Os biocombustíveis surgem como uma alternativa para substituir os derivados de petróleo, principalmente no que se refere aos combustíveis líquidos. Gramíneas com metabolismo fotossintético C₄, como a cana-de-açúcar, ocupam papel de destaque para a produção de biocombustíveis. Contudo, diversos fatores limitam o aumento de produtividade desta cultura, que é a principal cultura energética do Brasil, com destaque para a disponibilidade de recursos hídricos. Uma maneira de aumentar a tolerância ao estresse hídrico destas plantas de interesse energético é por meio de abordagens biotecnológicas, através da inserção de genes que promovam o acúmulo de metabólitos osmoprotetores, como os polióis. Os polióis atuam nas respostas contra estresses bióticos e abióticos, sendo solutos osmoticamente ativos, que acumulam-se em altos níveis dentro da célula para compensar o potencial hídrico reduzido. O mio-inositol é um poliol derivado de glicose-6-fosfato (G6P) que atua como precursor para diversos metabólitos relacionados com síntese da membrana e proteção à estresse. A L-galactose 1-fosfato fosfatase (VTC4, EC 3.1.3.B9) é uma enzima bifuncional, que afeta as vias de síntese de mio-inositol e do ascorbato. Esta enzima catalisa a síntese *de novo* de mio-inositol hidrolisando o L-mio-inositol-1-fosfato e também atua na síntese de ascorbato, hidrolisando a L-Galactose-1-fosfato. Assim, o presente trabalho pretende aumentar a tolerância a estresses abióticos na planta modelo de metabolismo fotossintético C₄ em gramíneas, *Setaria viridis*, através da superexpressão do gene VTC4. As análises indicaram que a superexpressão do gene *CsVTC4* resultou em plântulas de *Setaria viridis* com maior tolerância ao estresse salino. Portanto, a inserção de genes da via do mio-inositol pode ser um caminho para a criação de linhagens resistentes a estresses osmóticos em plantas C₄ de interesse energético.

Palavras-chave: Biocombustíveis. Melhoramento genético. Mio-inositol. *Setaria viridis*. VTC4.

ABSTRACT

Diversification of the energy matrix aimed at reducing greenhouse gasses (GHG) emissions through fossil fuels substitution is a global objective. Biofuels emerge as an alternative to replace petroleum derivatives, especially regarding liquid fuels. C4 metabolism grasses, such as sugarcane, have a prominent role in agriculture for biofuels production. However, several factors limit sugarcane productivity, which is the main energy crop in Brazil, on top of them the availability of water resources. One way to increase tolerance to hydric stress is inserting genes that promote accumulation of osmoprotective metabolites, such as polyols. Polyols act in responses against biotic and abiotic stresses and as osmotically active solutes, accumulating at high levels within the cell to compensate the reduced water potential. Myo-inositol is a polyol derived from glucose-6-phosphate (G6P) that acts as a precursor for several metabolites related to membrane synthesis and stress protection. L-galactose 1-phosphate phosphatase (VTC4, EC 3.1.3.B9) is a bifunctional enzyme that affects the myo-inositol and ascorbate synthesis pathways. This enzyme catalyzes *de novo* synthesis of myo-inositol by hydrolyzing L-myo-inositol-1-phosphate and also acts on ascorbate synthesis by hydrolyzing L-Galactose-1-phosphate. Thus, the present work intends to increase tolerance to abiotic stresses of the C4 photosynthetic metabolism model plant in grasses, *Setaria viridis*, promoting overexpression of the VTC4 gene. Analyzes indicated that overexpression of the *CsVTC4* gene resulted in *Setaria viridis* seedlings with greater tolerance to salt/osmotic stress. Therefore, the insertion of myo-inositol pathway genes may be an approach to create strains resistant to osmotic stress in C4 plants.

Keywords: Biofuels. Genetic improvement. Myo-inositol. *Setaria Viridis*. VTC4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Funcionalidades do mio-inositol no metabolismo vegetal.....	15
Figura 2 – Vias envolvidas na biossíntese e regeneração do ascorbato em plantas.	17
Figura 3 – Mapa do vetor binário utilizado para transformação de plantas de <i>Setaria viridis</i> mediada por <i>Agrobacterium</i>	21
Figura 4 – Etapas do protocolo de transformação genética de <i>S. viridis</i>	23
Figura 5 – Árvore filogenética do PFAM00459 (Inositol monophosphatase family)...	28
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo do produto de PCR para confirmação da inserção do T-DNA em plantas transformadas.....	30
Figura 7 – Expressão relativa usando RT-qPCR para eventos transgênicos superexpressando o gene <i>CsVTC4</i> em <i>Setaria viridis</i>	30
Figura 8 – Taxa de germinação das plântulas WT e eventos transgênicos em diferentes concentrações de NaCl.....	31
Figura 9 – Germinação de <i>Setaria viridis</i> em meio de cultura suplementado com NaCl.....	32
Figura 10 – Raízes das plântulas de <i>S. viridis</i> selvagem e eventos superexpressando o gene da proteína <i>CsVTC4</i> germinados em meio suplementado com 0, 30, 90 e 150 mmol/L de NaCl.....	33
Figura 11 – Comprimento da raiz das plântulas WT e eventos <i>CsVTC4</i> em diferentes concentrações de NaCl.....	34
Figura 12 – Peso das plântulas WT e <i>CsVTC4</i> em diferentes concentrações de NaCl.....	35
Figura 13 – Análise de componentes principais do perfil metabólico das plântulas transformadas e selvagens em diferentes concentrações de NaCl.....	36
Figura 14 - Perfil metabólico de plântulas de cinco linhagens transgênicas de <i>Setaria viridis</i> comparado à linhagem selvagem com 10 dias de idade germinadas em meio suplementado com 90 mM de NaCl.....	37
Figura 15 - Perfil metabólico de plântulas de cinco linhagens transgênicas de <i>Setaria viridis</i> comparado à linhagem selvagem com 10 dias de idade germinadas em meio suplementado com 150 mM de NaCl.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
BSTFA - N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CIM - Meio de indução de calos
CO₂ - Dióxido de Carbono
CsVTC4 - L-galactose-1-fosfato fosfatase de *Coccomyxa subellipsoidea*
D/R - Dessecação/Reidratação
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DNAg - Ácido Desoxirribonucleico genômico
G6P - Glicose-6-Fosfato
GC/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GEE - Gases de Efeito Estufa
GHG - Greenhouse Gases
IAA - Ácido indolacético
IMP - Inositol Monofosfatase
L-Gal 1-P - L-galactose-1-fosfato
MCA - Metanol:clorofórmio:água
MI - Mio-inositol
MIPS - Mio-inositol-1-fosfato sintase
MRS - Meio de regeneração de *Setaria*
MS - Murashige & Skoog
NaCl - Cloreto de Sódio
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PFAM - Base de dados de famílias de proteínas
Proálcool - Programa Nacional do Álcool
RFO - Oligossacarídeos da família da rafinose
RNA - Ácido ribonucleico
RNAseq - Sequenciamento de RNA
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real
WT - Wild type

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	11
1.2	MIO-INOSITOL.....	14
1.3	A L-GALACTOSE 1-FOSFATO FOSFATASE (VTC4).....	17
1.4	<i>SETARIA VIRIDIS</i>	18
2.	OBJETIVOS	19
3.	METODOLOGIA	20
3.1	Análises in silico e construção do vetor.....	20
3.2	Transformação Genética.....	21
3.3	Análises Moleculares.....	23
3.4	Aplicação de estresse.....	24
3.5	Análises Biométricas.....	24
3.5.1	Taxa de Germinação.....	24
3.5.2	Crescimento Radicular.....	25
3.5.3	Biomassa das plântulas.....	25
3.6	Metabolômica.....	25
3.7	Análise Estatística.....	26
4.	RESULTADOS	27
4.1	Análises in silico.....	27
4.2	Transformação Genética.....	29
4.3	Análises Moleculares.....	30
4.4	Aplicação de estresse.....	31
4.5	Análises biométricas.....	31
4.5.1	Taxa de Germinação.....	31
4.5.2	Crescimento Radicular.....	33
4.5.3	Biomassa das plântulas.....	34
4.6	Metabolômica.....	35
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39

6.	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	APÊNDICE A.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

O uso de combustíveis fósseis responde por 78% do aumento da emissão de Gases de efeito estufa (GEE) entre 1970 e 2011 (EPA, 2021) e é considerado o maior responsável pelas emissões antropogênicas destes gases (Quadrelli e Peterson, 2007). As emissões futuras de CO₂ estimadas apenas para a infraestrutura já existente de combustíveis fósseis ultrapassam a emissão máxima que limita o aquecimento global em 1,5 °C comparado ao nível pré-industrial (IPCC, 2022), limite estabelecido no acordo de Paris.

A presença excessiva desses gases na atmosfera resulta em consequências adversas para o meio ambiente e para a saúde e bem-estar da população em geral, como por exemplo, maior incidência de doenças cognitivas, pulmonares e cardíacas (Karnauskas *et al.*, 2016) além de aumento da temperatura média global e das áreas inundadas (IPCC, 2022). Isso pode levar à perda de áreas agricultáveis, alteração da disponibilidade de chuvas, impactando diretamente a produção agrícola.

Logo, a redução dessa infraestrutura e o uso de combustíveis alternativos, como o etanol, contribuem para alinhar as emissões do setor energético com o limite definido para mitigar os efeitos das mudanças climáticas (IPCC, 2022). Uma das possibilidades para atingir esse objetivo é a produção de biocombustíveis, como o etanol, cuja redução de emissão de GEE em relação à gasolina já é confirmada e é esperado que com o desenvolvimento de novas tecnologias se torne cada vez mais vantajoso frente ao uso de combustíveis fósseis (Wang *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, gramíneas de metabolismo C₄, como o milho e a cana-de-açúcar, que já tinham papel importante na alimentação mundial vêm ganhando atenção para a produção de biocombustíveis, como o etanol. O etanol junto com os produtos de cana-de-açúcar apresenta a participação notável de 19,1% na matriz energética brasileira (MME, 2021). A produção de etanol possui balanço energético e de emissão de GEE favorável (Sousa *et al.*, 2011) e é de grande importância econômica para o Brasil, que é o maior produtor de cana-de-açúcar e segundo maior produtor de etanol mundial (SAA SP, 2020).

O investimento massivo na produção de biocombustíveis no país data desde a década de 70, com o lançamento do programa nacional do álcool (Proálcool). Em

1975, impulsionado pela crise do petróleo e por problemas na balança de pagamentos, o Brasil buscou aumentar sua independência energética lançando o Proálcool (Távora, 2011). Esse programa incentivou a produção de bioetanol, levando o país ao pioneirismo referente à produção e uso deste biocombustível.

Estima-se que somente entre 2000 e 2011 o uso de biocombustíveis no Brasil tenha evitado a emissão de 310 milhões de toneladas de CO₂ quando comparado ao uso de gasolina e diesel, sendo que 94% das emissões evitadas estão ligadas diretamente ao uso de etanol (35%). Além disso, a emissão de gases nocivos provindos da queima de aditivos da gasolina, como compostos sulfúricos, compostos aromáticos, monóxido de carbono e matérias particuladas são significativamente maiores quando comparado com o uso de etanol (Goldemberg *et al.*, 2008).

Como os biocombustíveis apresentam diversas vantagens frente aos combustíveis fósseis, espera-se que sua demanda global cresça 41 bilhões de litros, ou 28%, entre 2021-2026, segundo estudo realizado pela agência internacional de energia (IEA, 2021).

Portanto, a produção de biocombustíveis seguirá aumentando. Mas, desmatar a vegetação nativa para cultivar biomassa não é uma opção viável, já que esta ação pode emitir de 17 a 420 vezes mais CO₂ do que seria evitado substituindo o uso de combustíveis fósseis por biocombustíveis. Por outro lado, o cultivo em terras abandonadas ou degradadas gera pouca ou nenhuma dívida de carbono (Fargione *et al.*, 2008).

No Brasil, somente na região Nordeste, há uma área equivalente a 155 milhões de hectares afetados pela salinidade (Vieira *et al.*, 2016). Os solos salinos são áreas degradadas, onde a troca de água e nutrientes é limitada entre o solo e a planta, o que afeta negativamente a produtividade agrícola (FAO, 2020).

Além disso, a disponibilidade de água está profundamente envolvida no crescimento vegetativo e reprodutivo das plantas, modulando o suprimento de energia e sua demanda na célula. Eventos de seca, que causam déficit hídrico nos vegetais (Gilbert e Medina, 2016), têm sido agravados pelo fenômeno de mudanças climáticas (Dai, 2013) e estão associados a perdas significativas na produtividade das culturas, com potencial para desestabilizar os sistemas de produção (Lesk *et al.*, 2016).

A disponibilidade de água é o principal fator limitante do rendimento da cana (Dias e Sentelhas, 2019). No Brasil a irrigação dessas plantações não é uma prática

comum (Macedo *et al.*, 2005), o que restringe o cultivo às regiões em que o regime de chuvas seja adequado ao cultivo ao longo de todo o ano e sujeita o desempenho da indústria canavieira às condições climáticas.

Percebe-se que os fatores climáticos são relevantes quando ao analisar os dados de produtividade do setor canavieiro brasileiro é possível notar que em 2021 a produção foi amplamente atingida pela seca e por geadas, sendo que a moagem de cana encerrou o ciclo com retração de 13,6% frente ao ano anterior após sucessivos anos de crescimento (UNICA, 2022).

Levando em conta o cenário de alteração das condições climáticas, a crescente demanda de energia, o espaço limitado para a agricultura e a necessidade de diminuir o uso de combustíveis fósseis e de recursos hídricos, é preciso buscar soluções inovadoras que permitam o aumento da produtividade dos cultivos de interesse energético sem que isso implique em maior uso de recursos naturais.

Desta maneira, com a previsão de aumento da produção, da demanda e da exportação de etanol brasileiro nos próximos anos (MME, 2019), uma alternativa para evitar a inserção de cultivos de biomassa nas áreas de vegetação nativa e mitigar a perda de produção seria o uso de ferramentas biotecnológicas com finalidade de aumentar a produtividade e tolerância dessas culturas frente a diferentes tipos de estresse (Datta, 2013) ou de obter plantas que sejam capazes de se desenvolver em terras inadequadas para outros cultivos, como por exemplo, em solos salinos.

O melhoramento tradicional é baseado na variação genética natural limitada (Rodriguez *et al.*, 2017), dependendo de longos tempos de geração dos cruzamentos (Hickey *et al.*, 2019). As estratégias baseadas em engenharia genética ampliam o pool gênico disponível para o melhoramento genético com melhor controle da transferência genética (Boehm e Bock, 2019), mantendo características já adquiridas e desejadas nos indivíduos geneticamente transformados.

Um exemplo do uso dessas tecnologias de recombinação genética é a superexpressão de genes relacionados com a síntese de polióis com objetivo de conferir à planta tolerância ao estresse abiótico, já que esses compostos participam da adaptação ao estresse em plantas e algas e agem como reguladores osmóticos (Li *et al.*, 2020). Desse modo, o melhoramento genético através da inserção de genes relacionados com a síntese de mio-inositol pode possibilitar a expansão das áreas propícias ao cultivo de culturas energéticas sem aumentar a demanda de

recursos hídricos, pois permitiria a criação de cultivares que demandam menos água para o seu desenvolvimento e que toleram condições de estresse abiótico.

1.2 Mio-inositol

Superexpressar genes que participam da produção de moléculas osmoprotetoras como os polióis, pode conferir tolerância à estresses abióticos em plantas, como o estresse hídrico ou salino. Os polióis estão presentes em diferentes formas de vida e são relacionados a diversas funções nos organismos. Em plantas, são moléculas cruciais na sinalização para adaptação a diferentes tipos de estresse (Noiraud *et al.*, 2001) e atuam como scavengers de espécies reativas de oxigênio (ROS), crioprotetores, regulam o transporte e absorção de sódio e tem papel central no crescimento e desenvolvimento das plantas (Smirnoff e Cumbes, 1989; Hu *et al.*, 2020; Nelson *et al.*, 1999).

Os polióis atuam na translocação e armazenamento de produtos fotossintéticos e nas respostas contra estresses bióticos e abióticos nas plantas (Kanayama, 2009). Estes compostos são moléculas orgânicas que possuem grupos funcionais hidroxila e atuam como solutos osmoticamente ativos, acumulando-se em altos níveis dentro da célula para compensar o potencial hídrico reduzido. Seus grupos hidroxila podem efetivamente substituir a água no estabelecimento de ligações de hidrogênio, protegendo as membranas e mantendo a atividade enzimática (Noiraud *et al.*, 2001). Além disso, estão relacionados à eliminação de espécies reativas de oxigênio (Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2008).

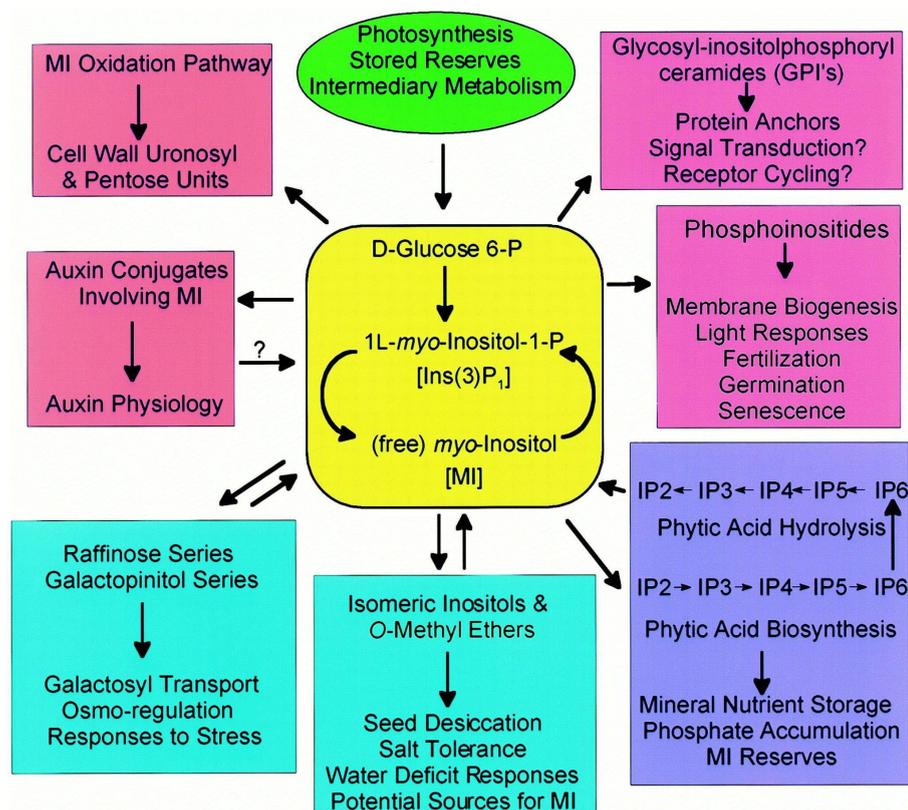
O mio-inositol (MI) é um poliol cíclico importante, presente em plantas, animais, leveduras e microrganismos. Mais de 37 metabólitos derivados do mio-inositol foram identificados em sistemas biológicos. Esses metabólitos exibem funções diversificadas em respostas ao estresse e sinalização celular (Valluru e Van Den Ende, 2011).

O MI e seus metabólitos são osmoprotetores e crioprotetores, regulam o transporte e absorção de sódio e tem papel central no crescimento e desenvolvimento das plantas (Smirnoff e Cumbes, 1989; Hu *et al.*, 2020; Nelson *et al.*, 1999).

As principais funcionalidades do mio-inositol no metabolismo vegetal estão descritas na Figura 1, destacado em rosa observa-se as funcionalidades

relacionadas com a síntese de membrana, parede celular, crescimento e sinalização, em roxo as relacionadas com armazenamento de fosfato e em azul as relacionadas com adaptação a estresse e produção de osmólitos.

Figura 1 – Funcionalidades do mio-inositol no metabolismo vegetal



Fonte: Loewus e Murthy, 2000.

Em algas das espécies *Trebouxia* sp. e *Coccomyxa* expostas a ciclos de dessecação e reidratação (D/R), diversos polióis são acumulados, demonstrando papel crucial desses compostos na tolerância à seca. Ácido ascórbico e oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) também foram acumulados nessas espécies durante o estresse hídrico (Centeno *et al.*, 2016). Em estudo do mesmo grupo de pesquisa com essas algas, identificou-se maior expressão de genes relacionados com a via do MI e dos RFOs durante os ciclos D/R, incluindo o gene da mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS) (Hell *et al.*, 2021), enzima limitante da biossíntese de MI.

O metabolismo deste poliol produz moléculas sinalizadoras que atuam em vários processos, como síntese de solutos, tolerância ao estresse e regulação da

morte celular (Valluru e Van Den Ende, 2011). Além disso, outros produtos da via do MI têm papel na síntese de pectina da parede celular e de compostos não celulósicos. O metabolismo deste polioliol envolve a produção de outras moléculas osmoprotetoras, tais como RFOs, pinitol e ononitol (Loewus e Murthy, 2000), além disso o MI se liga às auxinas, como o ácido indolacético (IAA), para transporte no floema. O IAA é um hormônio de crescimento vegetal e a conjugação com o inositol previne a atividade desses hormônios, permitindo que sejam transportados por longas distâncias dentro da planta (Cohen e Bandurski, 1982).

A tolerância à salinidade do ambiente também é frequentemente associada a plantas sintetizadoras de polióis (Noiraud *et al.*, 2001). O MI atua na sinalização entre a folha e a raiz promovendo a absorção de sódio e a adaptação ao estresse salino (Nelson *et al.*, 1999).

As plântulas de *Mesembryanthemum crystallinum* são susceptíveis ao sal, enquanto as plantas maduras da mesma espécie são tolerantes à salinidade. Contudo, quando as plântulas foram expostas ao estresse salino e suplementadas com adição de MI exógeno, estas apresentaram padrões de expressão gênica e de acúmulo de polioliol iguais aos observados em plantas maduras, aumentando a adaptação ao estresse. Notou-se que a absorção e o transporte de sódio através do xilema das plântulas foram aumentados na presença de MI, indicando dependência da captação de sódio e na distribuição do MI (Nelson *et al.*, 1999).

A aplicação exógena de MI em *Agrostis* demonstrou que as plantas tratadas apresentaram maior eficiência no uso de água e maior expressão de enzimas antioxidantes do que as plantas controle (Li *et al.*, 2020).

Uma das enzimas chaves na biossíntese de mio-inositol é a MIPS, que atua na etapa limitante da síntese deste polioliol (Yu *et al.*, 2017). Estudos verificaram o aumento da expressão de MIPS em condições de estresse salino e hídrico em plantas (Nelson *et al.*, 1998; Khurana *et al.*, 2012). Em batata, eventos superexpressando MIPS exibiram crescimento e bom enraizamento em meio suplementado com NaCl, em contraste com os eventos selvagens que mostraram baixo crescimento (Zhai *et al.*, 2016).

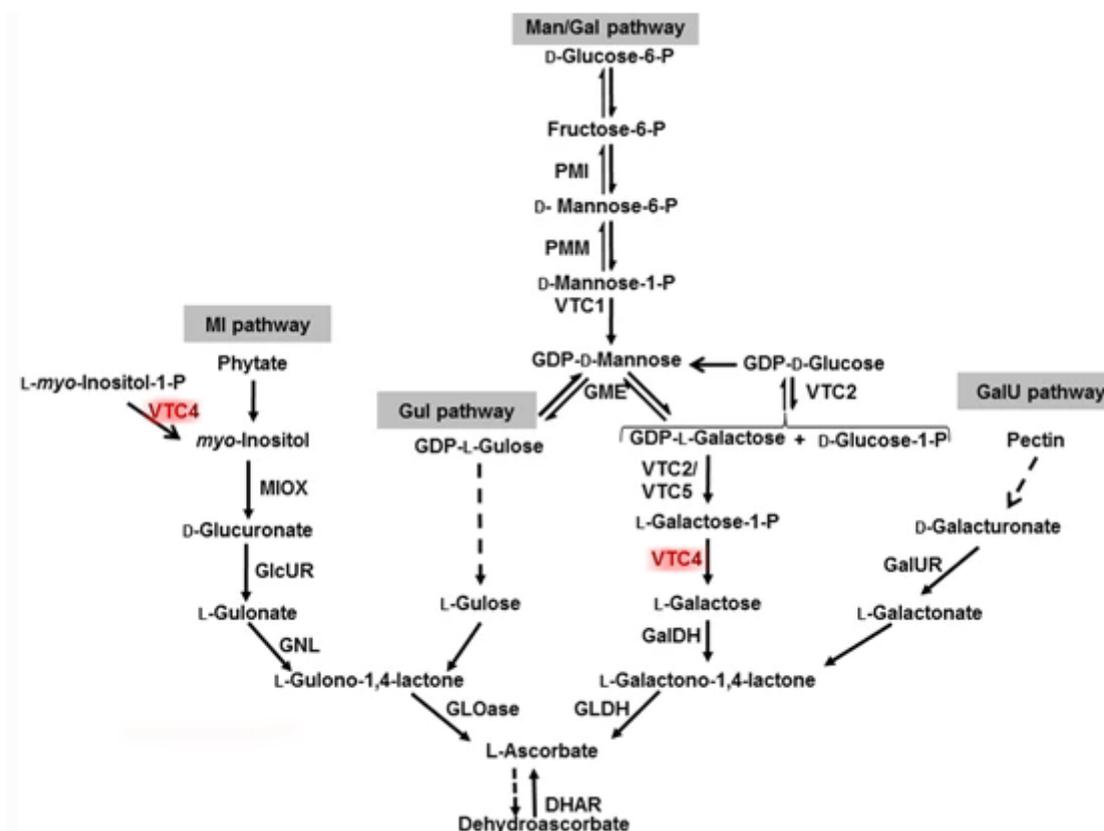
A superexpressão de MIPS em maçã resultou em plantas mais tolerantes à seca, que apresentaram maior recuperação ao estresse e maior conteúdo relativo de água (Ling-Yu *et al.*, 2022).

Portanto, espera-se que a superexpressão de genes envolvidos no metabolismo do MI possa conferir proteção às condições de estresse osmótico, como déficit hídrico e salinidade, causando desvios metabólicos e fornecendo mecanismos mais robustos para aumentar a resiliência das plantas frente às condições ambientais extremas.

1.3 A L-galactose 1-fosfato fosfatase (VTC4)

A proteína VTC4 é uma enzima bifuncional que afeta as vias de síntese de mio-inositol e do ascorbato (Torabinejad *et al.*, 2009). Esta enzima catalisa a síntese *de novo* de mio-inositol hidrolisando L-mio-inositol-1-fosfato e também atua na síntese de ascorbato, hidrolisando a L-Galactose-1-fosfato. A sequência gênica utilizada neste estudo é proveniente de *Coccomyxa subellipsoidea* e codifica a enzima CsVTC4, cuja atuação na via metabólica do mio-inositol e do ascorbato está ilustrada na Figura 2.

Figura 2 – Vias envolvidas na biossíntese e regeneração do ascorbato em plantas. Etapas catalisadas pela VTC4 destacadas em vermelho.



Fonte: Modificado de Lisko *et al.*, 2014.

O ácido ascórbico é um composto que age como antioxidante e também como doador de elétrons para diferentes reações enzimáticas e não enzimáticas. Além disso, atua como um cofator para diversos sistemas enzimáticos (Carr e Maggini, 2017). Nas plantas, o ácido L-ascórbico é um potencial antioxidante não enzimático que atua na proteção ao estresse abiótico (Mittler, 2002).

Linhagens de *Arabidopsis* mutantes apresentando perda de função da enzima VTC4 mostraram que o knockout da enzima leva a menor acúmulo de mio-inositol e de ascorbato nas plantas, as quais apresentaram perturbação nas respostas contra o frio e estresse salino. Os mutantes VTC4 tiveram germinação e crescimento radicular mais lentos no frio e menor germinação no meio salino, indicando um aumento geral na sensibilidade a estresses abióticos (Torabinejad *et al.*, 2009).

1.4 *Setaria viridis*

Estudos utilizando eventos transgênicos de *Setaria viridis* proporcionaram resultados que reforçam a utilização dessa espécie como prova-de-conceito para avaliação de estudos funcionais relacionados às características de interesse agrônomo de gramíneas com metabolismo C4, que podem ser posteriormente transferidas para espécies de interesse econômico. Essa espécie apresenta características que viabilizam estudos funcionais, como protocolos de transformação genética eficientes e bem estabelecidos, ciclo de vida curto, genoma pequeno e sequenciado e geração profílica de sementes (Martins *et al.*, 2015).

O gênero *Setaria* conta com mais de 100 espécies, onde duas se destacam: a *Setaria italica* e a *Setaria viridis*. As duas espécies são filogeneticamente próximas, sendo que a segunda espécie é considerada ancestral (Kellogg, 2017). Atualmente *Setaria viridis* ganhou notoriedade sendo usada como planta modelo para pesquisas básicas e aplicadas em Poaceae, pois pertence ao mesmo grupo filogenético de culturas como o milho, sorgo e a cana-de-açúcar, que possuem grande importância econômica, alimentar e energética (Bennetzen *et al.*, 2012; Brutnell *et al.*, 2010; Doust *et al.*, 2009).

S. viridis possui metabolismo fotossintético C4, sendo assim possui vantagens adaptativas aos estresses abióticos como: seca, calor e frio, resultando em possíveis rendimentos elevados em comparação com as plantas de metabolismo C3, devido a diferenças anatômicas e bioquímicas, em que o dióxido de carbono concentra-se em

torno da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RubisCO) (Coelho *et al.*, 2017).

Com o sucesso e as limitações gerados após anos de utilização de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, uma nova demanda levou ao estudo aprofundado de *Setaria viridis* como um sistema modelo alternativo para culturas de metabolismo C4 (Bennetzen *et al.*, 2012; Brutnell *et al.*, 2010; Doust *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

O presente TCC tem como principal objetivo avaliar eventos de *Setaria viridis* superexpressando o gene envolvido na síntese de polióis (*CsVTC4*) quanto a tolerância a estresses abióticos e seus objetivos específicos são:

- Identificar a sequência do gene alvo em *Coccothryxa subellipsoidea* e inseri-la em um vetor de expressão;
- Obter eventos transgênicos homozigotos de *Setaria viridis* superexpressando o gene *CsVTC4*, responsável pela síntese de mio-inositol;
- Avaliar a tolerância das plantas transgênicas submetidas a estresses abióticos em comparação às plantas selvagens;
- Identificar alterações metabólicas e biométricas nas plantas transformadas em relação às plantas selvagens.

3. METODOLOGIA

3.1 Análises *in silico* e construção do vetor

Foram identificados os genes superexpressos em um experimento de RNAseq realizado em *Coccomyxa simplex*, submetido a dessecação completa, em colaboração com a Universidade de Alcalá de Henares, Espanha. Com base neste estudo, foram selecionados e investigados os genes putativos envolvidos na síntese de polióis durante a perda severa de água (Hell et al., 2021).

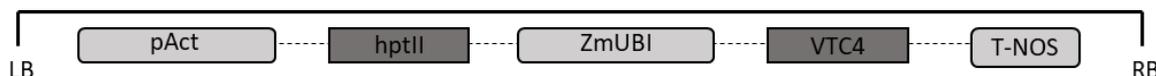
As sequências foram comparadas usando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), com a sequência de referência de *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 v2.0 no banco de dados Phytozome v12.1.6 (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein et al., 2012).

O código PFAM00459 foi identificado para a família de enzimas mio-inositol monofosfatase (IMP) e usado para buscar sequências ortólogas das seguintes espécies a fim de construir uma árvore filogenética: (i) *Volvox carteri* v2.1 – Vocar; (ii) *Chlamydomonas reinhardtii* v5.5 – Cre; (iii) *Coccomyxa subellipsoidea* C169 v2.0; (iv) *Physcomitrella patens* v3.3 – Pp; (v) *Arabidopsis thaliana* TAIR10 – ATG; (vi) *Brachypodium distachyon* v3.1 – Bradi; (vii) *Sorghum bicolor* v3.1.1 –Sobic; (viii) *Setaria viridis* v2.1 – Sevir; (ix) *Setaria italica* v2.2 – Seita; (x) *Zea mays* Ensembl-18 – GRMZM; (xi) *Oryza sativa* v7_JGI – LOC_Os.

As sequências foram alinhadas usando o software MUSCLE (Edgar, 2004) e a árvore foi construída no software PhyML (Guindon et al., 2003; Anisimova et al., 2006) com base em sequências de aminoácidos usando o software Phylogeny (http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi) (Dereeper et al., 2008) através do método de máxima verossimilhança e foi visualizada através do TreeDyn (Chevenet et al., 2006).

A sequência utilizada teve seus códons verificados e ajustados para monocotiledôneas. A clonagem foi realizada pela DNA Cloning Service (Hamburgo, Alemanha). O gene foi clonado sob o controle do promotor constitutivo de ubiquitina de milho (ZmUB11) contendo um gene de resistência à higromicina (hptII) (Figura 3).

Figura 3 - Mapa do vetor binário utilizado para transformação de plantas de *Setaria viridis* mediada por *Agrobacterium*.



(LB) Borda Esquerda, (RB) Borda Direita, (pAct) Promotor constitutivo de actina, (hptII) Gene de resistência à higromicina, (ZmUBI) Promotor constitutivo de ubiquitina de milho, (VTC4) Gene da L-galactose-1-fosfato fosfatase de *Cocomyxa subelipsoidea* e (T-NOS) Terminador da nopalina sintetase.

Fonte: Elaboração própria

O vetor foi inserido em *Escherichia coli* cepa MACH1T1 por choque térmico. O DNA plasmidial foi extraído e a presença do vetor foi confirmada por PCR utilizando o primer para higromicina (F:CTCGTGCTTTCAGCTTCGATGT e R:CGAAATTGCCGTCAACCAAGCT). O mesmo processo foi realizado com *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA105 α utilizada para a transformação genética de *S. viridis*.

3.2 Transformação Genética

Sementes maduras de *Setaria viridis* selvagem linhagem A10.1 foram usadas para indução de calos embriogênicos. As sementes tiveram as lemas e páleas removidas com auxílio de uma lixa e posteriormente foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 10% e Tween 20 a 0,1% por 5 min, seguido de 5 lavagens em água destilada estéril.

Depois as sementes foram colocadas em um papel de filtro estéril para secar e em seguida foram transferidas para o meio de indução de calo (CIM) [4,3 g/L de sais de MS, 1 mg/L d-biotina, 0,5 mg/L de piridoxina HCl, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,1 mg/L tiamina-HCl, 100 mg/L de mio-inositol, 0,6 mg/L CuSO₄, 30 g/L sacarose, 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,5 mg/L de kinetina e 4 g/L Phytigel™]. O pH do meio foi ajustado para 5,8.

Após 3 a 5 semanas de incubação no escuro a 25 °C, os calos embriogênicos foram isolados e subcultivados em meio CIM. Após aproximadamente uma semana, os explantes foram utilizados para a transformação.

A cultura primária de *A. tumefaciens* (EHA 105 α) previamente transformada com o plasmídeo de interesse foi preparada inoculando uma colônia em 5 mL de LB contendo 100 mg/L de espectinomicina e 50 mg/L de rifampicina.

A cultura bacteriana foi incubada por 16 h em um agitador orbital a 180 rpm a 28 °C. A cultura secundária foi iniciada pela transferência de 2 mL de cultura primária em 20 mL de meio LB suplementado com 200 µM de acetoseringona, 100 mg/L de espectinomicina e 50 mg/L de rifampicina e foi cultivada até atingir $OD_{600} = 0,6$. A suspensão bacteriana foi centrifugada e o pellet foi ressuspensão em meio CIM líquido.

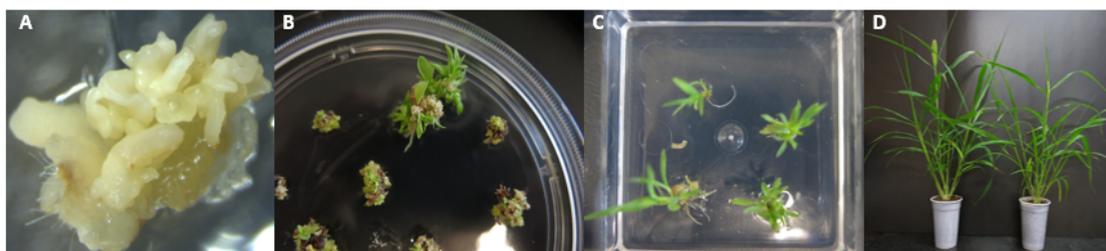
Os calos embriogênicos foram incubados por 5 min em suspensão de *A. tumefaciens* contendo 200 mM de acetoseringona e 10 µL de Solução Synperonic 10% PE/F68 (Sigma–Aldrich) a cada 1 mL de suspensão.

Os calos foram co-cultivados em meio CIM suplementado com 200 µM de acetoseringona por 3 dias no escuro a 22 °C. Seguindo co-cultivo, os calos foram transferidos para meio CIM suplementado com 150 mg/L Timentin por uma semana no escuro em 25 °C e transferidos para meio seletivo CIM contendo 30 mg/L de higromicina B e 150 mg/L de Timentin seguindo as mesmas condições de cultivo.

Uma semana depois, os explantes foram transferidos para um meio de regeneração (MRS) [4,3 g/L sais MS, 1 mg/L d- biotina, 0,5 mg/L de piridoxina HCl, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 100 mg/L mio-inositol, 0,1 mg/L de tiamina HCl, 20 g/L de sacarose, 2 mg/L de cinetina, 150 mg/L Timentin, 30 mg/L de higromicina B, 4 g/L Phytigel™] com pH ajustado para 5,8.

Os calos em meio de MRS foram transferidos para luz branca fria ($75 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) seguindo as condições de fotoperíodo e temperatura descritos acima. As plântulas regeneradas foram transferidas para Magenta™ contendo meio basal MS 150 mg/L Timentin, 30 mg/L de higromicina B, por aproximadamente 15 dias para promover o enraizamento. Após o enraizamento as plântulas foram aclimatadas utilizando Substrato+vermiculita (3:1), e as plantas foram cultivadas sob 16/8 horas (luz/escuro) com intensidade de luz de $500 \text{ µmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de 26 °C e umidade relativa de 65%, até senescência da planta (Martins *et al.*, 2015). As principais etapas do protocolo de transformação estão ilustradas na Figura 4.

Figura 4 - Etapas do protocolo de transformação genética de *S. viridis*.



(A) obtenção de calos embriogênicos a partir de sementes viáveis (B) Regeneração de explantes após transformação (C) seleção e enraizamento dos potenciais eventos independentes de transformação (D) plantas adultas transformadas geneticamente.

Fonte: Elaboração própria.

Ao final do ciclo, as sementes foram coletadas e utilizadas para obtenção de linhagens homozigotas.

3.3 Análises Moleculares

As plantas regeneradas que se mostraram resistentes à higromicina foram utilizadas para extração de DNA, utilizando o método CTAB modificado (Doyle e Doyle, 1987). A inserção do gene foi confirmada por meio de PCR.

A análise de PCR para a detecção do transgene nas plantas foi realizada usando o par de primers específico da higromicina que deve gerar um fragmento de 244 pares de bases nas plantas transformantes (F:CTCGTGCTTTCAGCTTCGATGT e R:CGAAATTGCCGTCAACCAAGCT). A amplificação foi separada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v).

Para a análise de expressão relativa o RNA total de folhas foi isolado utilizando Trizol® (Thermo Fischer Sci.). O RNA total foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega), para eliminação de resíduos de DNA e posterior síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) com o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Sci.). Todos os processos acima listados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

As análises de RT-qPCR foram realizadas utilizando Platinum® SYBR® Green, e as alíquotas de cDNA obtidas foram utilizadas como template da reação. O protocolo utilizado foi o recomendado por Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Os níveis de expressão relativa foram calculados utilizando q-Gene (Muller, 2002). Os pares de primers SvCUL (Culina, Sevir.3G038900, F:

TCTCATCACGAGGGACTACTT e R: CTTGCCAACAACCACCAATC) e SvSUI (translation factor SUI1, Sevir.2G348300, F: CCAGAGCTTGGACAGGTCATTC e R: ACAATGCCAGCCTGGACAA) foram usados como genes de referência (Martins *et al.*, 2016) e as médias geométricas das quantidades relativas (RQs) foram calculadas utilizando o software BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). A eficiência individual de amplificação foi estabelecida por meio do LinRegPCR v.2013.0 na janela de linearidade (Ramakers *et al.*, 2003).

3.4 Aplicação de estresse

O meio utilizado para aplicação do estresse salino foi o meio de desenvolvimento para *Setaria viridis* que consiste em 2,15 g/L de sais de MS, 0,5 mg/L de piridoxina HCl, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,1 mg/L tiamina-HCl, 100 mg/L de mio-inositol e 4 g/L Phytigel™. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes de autoclavar e foi feita a suplementação com diferentes concentrações de NaCl (30, 90 e 150 mmol) após a esterilização. O meio utilizado para as plantas transformadas foi acrescido do agente de seleção (higromicina 60 mg/L). Em cada placa foram adicionados 30 ml do meio de desenvolvimento para *Setaria viridis*.

As sementes dos eventos em homozigose foram desinfestadas como descrito na seção de transformação antes de serem transferidas para as placas. Foram transferidas 50 sementes para cada placa.

Usou-se uma placa de cada tratamento (0, 30, 90 e 150 mmol NaCl) para cada evento. Após 8 a 10 dias, ocorreu a germinação das plântulas.

3.5 Análises Biométricas

3.5.1 Taxa de Germinação

Após o período de germinação das plântulas, as placas foram observadas e ocorreu a contagem das sementes germinadas em cada placa. Para o cálculo da taxa de germinação em cada nível de estresse e para cada evento, foi utilizado a fórmula abaixo.

$$Taxa\ germ = \frac{\% \text{ sementes germinadas na condição de estresse}}{\% \text{ sementes germinadas sem estresse}}$$

3.5.2 Crescimento Radicular

Plântulas ao final do período de submissão ao estresse salino foram utilizadas e a raiz principal foi medida, esse procedimento foi realizado com o auxílio de um paquímetro ou régua e os valores obtidos foram tabulados.

3.5.3 Biomassa das plântulas

Após 10 dias as plântulas foram retiradas do meio de cultura, secas em papel toalha e pesadas em balança analítica.

3.6 Metabolômica

Os tecidos frescos das plântulas foram coletados e preparados para análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

Aproximadamente 60 mg de material foram submetidos à extração em 500 µl de metanol:clorofórmio:água (MCA) na proporção de 12:5:1 e agitado em vórtex. A mistura foi aquecida (65 °C, 30 min, sob agitação) e centrifugada (13000 rpm, 5 min). A fase polar foi transferida e à ela foram adicionados 350 µl de água, após a agitação foi novamente centrifugada a 13000 rpm por 5 min. 300 µl da fase polar foram coletados, secos a vácuo, e posteriormente foi realizado o processo de sililação.

Ao material seco foram adicionados 150 µl de piridina e 50 µl de BSTFA, a mistura foi submetida à agitação e aquecida a 75 °C durante 1 hora. Amostras de 1 µl foram injetadas em um sistema GC/MS composto por um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas modelo GCMS QP-2010 SE Shimadzu.

A GC foi executada em uma coluna de 30 m HP5 com espessura de 0,25 mm. A temperatura de injeção foi de 230°C, a interface a 250°C, e a fonte de íons foi ajustada para 150°C. Hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de 1 ml min⁻¹. A análise foi executada utilizando-se o seguinte programa: 5 min de aquecimento isotérmico a 70°C, seguido de aumento da temperatura a 5 °C min⁻¹ até 310°C, e um minuto final de aquecimento a 310°C.

O sistema foi então equilibrado por 6 min a 70°C antes da injeção da próxima amostra. O espectro de massas foi gravado a 2 scan s⁻¹ na faixa entre 50 e 650 m/z. Ambos cromatogramas e espectros de massas foram avaliados e integrados usando

o programa GCMSolution versão 2.72 (Shimadzu Corporation) e comparados à NIST 08 Mass Spectral Library.

O perfil metabólico foi realizado para comparar o acúmulo de metabólitos polares e não polares entre plantas de tipo selvagem e transgênicas expostas a condições de estresse ou controle. A análise foi feita com tecido de plântulas com 10 dias de idade germinadas em meio MS suplementado com 30, 90 ou 150 mM de NaCl e controle (sem sal).

3.7 Análise Estatística

Os dados referentes aos parâmetros de crescimento e bioquímicos foram submetidos à teste de médias (teste t student) em nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), usando Software RStudio 1.4.1717, Boston, MA, www.rstudio.com.

4. RESULTADOS

4.1 Análises *in silico*

Análises *in silico* foram realizadas para que os principais genes da via de síntese de mio-inositol fossem identificados e o gene de interesse fosse selecionado. Para isso, a sequência de aminoácidos dos potenciais alvos foram analisadas em uma árvore filogenética juntamente com as sequências gênicas de outras espécies.

Para a busca, o PFAM correspondente a este domínio foi identificado. Utilizando a base de dados pública Phytozome, as sequências foram obtidas por meio de busca de palavra chave utilizando o PFAM00459 (Inositol monophosphatase family) para diferentes espécies: (i) *Volvox carteri* v2.1 – Vocar; (ii) *Chlamydomonas reinhardtii* v5.5 – Cre; (iii) *Coccomyxa subellipsoidea* C169 v2.0; (iv) *Physcomitrella patens* v3.3 – Pp; (v) *Arabidopsis thaliana* TAIR10 – ATG; (vi) *Brachypodium distachyon* v3.1 – Bradi; (vii) *Sorghum bicolor* v3.1.1 – Sobic; (viii) *Setaria viridis* v2.1 – Sevir; (ix) *Setaria italica* v2.2 – Seita; (x) *Zea mays* Ensembl-18 – GRMZM; (xi) *Oryza sativa* v7_JGI – LOC_Os.

Para esclarecer como se estabeleceria a relação filogenética entre todas estas classes pertencentes ao PFAM00459 foi feita uma árvore filogenética global, com as classes segundo a anotação do Phytozome: I - Inositol-1,4-bisphosphate 1-phosphatase, II - Histidinol-phosphatase, III - myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase, IV- L-galactose 1-phosphate phosphatase (VTC4) e V - 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase.

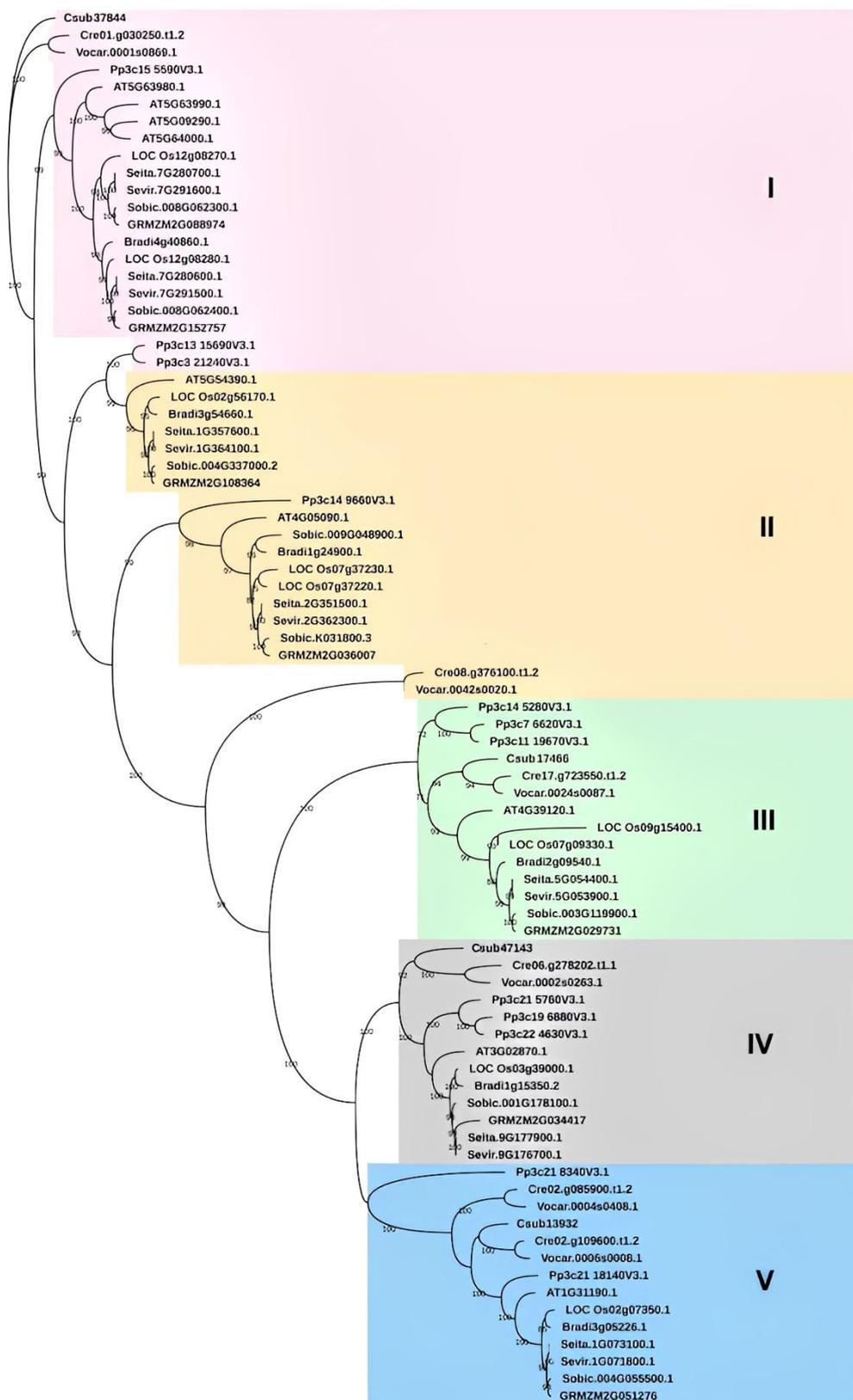
Após buscas na literatura sobre as classes de enzimas pertencentes ao PFAM00459 as enzimas pertencentes a classe L-galactose 1-phosphate phosphatase (VTC4) destacadas no colchete cinza na Figura 5 foram escolhidas.

É possível identificar que as sequências provenientes de plantas apresentam relações filogenéticas mais estreitas, o que ocorre de maneira similar em algas.

A sequência dos genes da família IV são completas, característica necessária para realizar os estudos funcionais.

O gene *CsVTC4* de *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 que possui 54,17% de similaridade com o mesmo gene de *Setaria viridis* foi selecionado para prosseguimento do estudo.

Figura 5 - Árvore filogenética do PFAM00459 (Inositol monophosphatase family). Grupo I 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase, grupo II PAP specific phosphatase, grupo III Histidinol-phosphatase, grupo IV Inositol Phosphate phosphatase, grupo V myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase



Tree scale: 1 |—————|

Fonte: Elaboração própria.

Em *Arabidopsis* o gene anotado como VTC4 (At3g02870) pertence a um grupo de polipeptídeos com um domínio conservado definido pelo HomoloGene do NCBI (cd01639). Este domínio conservado inclui primeiramente membros da família inositol monofosfatase (IMP) (Conklin *et al.*, 2006). *Arabidopsis* possui ainda dois outros genes At1g31190 e At4g39120 que foram classificados como IMP-like (IMPL) por causa da homologia com proteínas IMPs de procariotos. Laing *et al.* (2004) isolaram L-Gal 1-P fosfatase necessária para a síntese de ascorbato em plantas e observaram que em kiwi (*Actinidia deliciosa*) e em *Arabidopsis* a VTC4 promove a hidrólise de L-Gal 1-P.

Este fato levou à proposta de que VTC4 funcione principalmente para hidrolizar L-Gal-1-P durante a síntese de ascorbato e outras enzimas não identificadas que podem ser responsáveis pela síntese de novo de MI em plantas. Esta ideia foi evidenciada pelo fato de que mutantes com perda de função para o gene VTC4 contém baixos níveis de ascorbato (Conklin *et al.*, 2006).

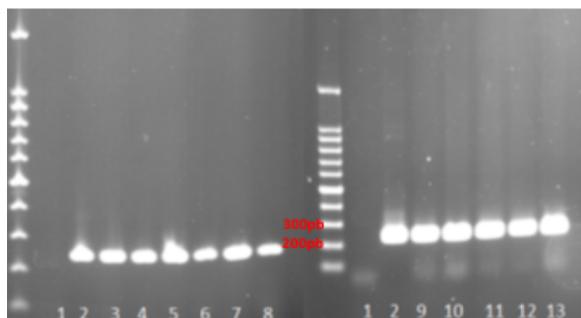
Uma vez determinada a sequência alvo, um vetor binário de transformação foi obtido por meio da empresa DNA Cloning Service. O vetor é composto pelas sequências: (i) pVS1 como origem de replicação (ii) *Sm/Sp* que confere resistência a espectinomicina, dentro da região do T-DNA é limitado pelas bordas direita e esquerda (LB e RB respectivamente), possuindo ainda gene *hptII* que confere resistência a higromicina sob o controle do promotor da actina de arroz (*Os_Act*), o gene alvo encontra-se sob o controle do promotor de ubiquitina-1 de milho (*UbiZm*) e uma região terminadora T-NOS. O vetor do gene L-galactose 1-phosphate phosphatase (*CsVTC4*) possui ~14kb.

4.2 Transformação Genética

A partir do protocolo de transformação descrito no item 3.2 foram obtidos 11 eventos transgênicos oriundos de calos embriogênicos independentes. Após a extração do DNA, foi realizada a confirmação da integração do transgene no genoma das plantas regeneradas em meio seletivo, com a técnica de PCR.

Foi testada a integração do gene alvo da L-galactose 1-phosphate phosphatase (*CsVTC4*), possibilitando a confirmação da sua inserção por meio da presença do amplicon esperado de 244 pb (Figura 6).

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo do produto de PCR para confirmação da inserção do T-DNA em plantas transformadas.



1- NT, 2- plasmídeo, 3-13 eventos T0 de transformação o gene L-galactose 1-phosphate phosphatase (*CsVTC4*) em *Setaria viridis*
Fonte: Elaboração própria

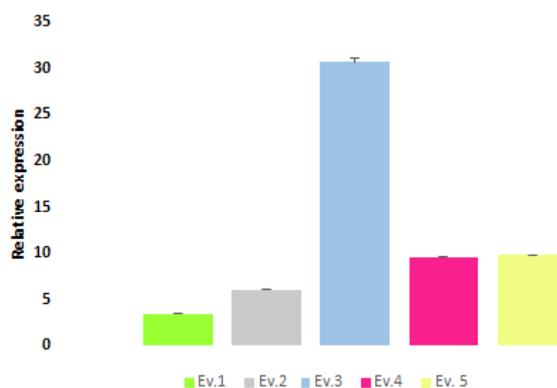
4.3 Análises Moleculares

Após a confirmação dos eventos transformados, procedeu-se com a segregação dos eventos, os que apresentaram padrão de segregação 3:1 foram selecionados e cultivados até a geração T2 onde avaliou-se a presença de 5 eventos em homozigose.

Com estes 5 eventos, procedeu-se com a análise da expressão gênica da *CsVTC4*. Os níveis de expressão do gene *CsVTC4* variaram de 3 – 30 vezes mais expresso em relação aos genes de referência.

O evento 3 apresentou o maior nível de superexpressão, o evento 4 e 5 uma superexpressão intermediária e os eventos 1 e 2 uma superexpressão menor, como indicado na Figura 7. O gradiente de expressão gênica encontrado nas plantas pode ser justificado pelo sítio de inserção do T-DNA.

Figura 7 - Expressão relativa usando RT-qPCR para eventos transgênicos superexpressando o gene *CsVTC4* em *Setaria viridis*



Fonte: Elaboração própria

4.4 Aplicação de estresse

Os eventos previamente selecionados por meio das análises moleculares foram submetidos a estresse salino. Os experimentos foram conduzidos em placas de petri contendo meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl (0, 30, 90 e 150 mM) a fim de analisar as respostas biométricas/fisiológicas das plântulas e o impacto do estresse para cada concentração. Para isso, foram analisados diferentes parâmetros: taxa de germinação, crescimento radicular, biomassa e perfil metabólico. No geral, os eventos transformados demonstraram maior resistência às condições de estresse comparado às plantas selvagens, como descrito no item 4.5.

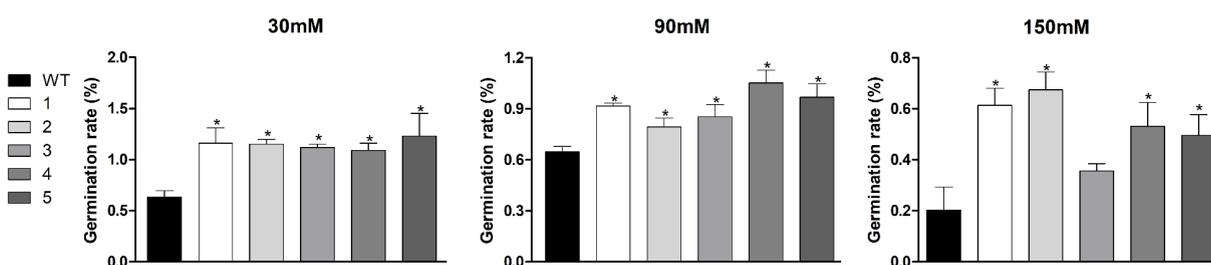
4.5 Análises biométricas

4.5.1 Taxa de Germinação

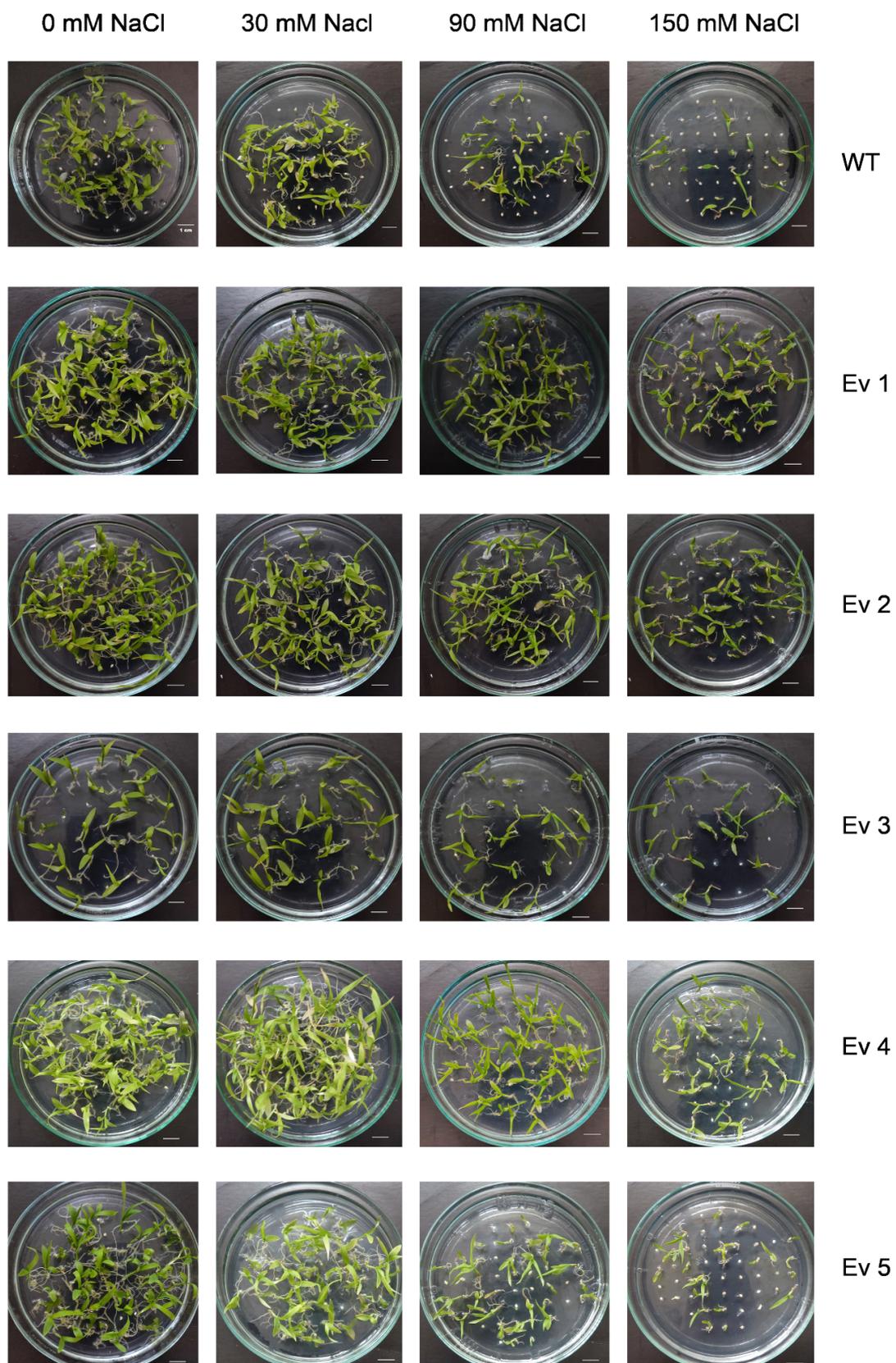
Após 10 dias em meio de cultura suplementado com NaCl foi observado a taxa de germinação dos eventos transgênicos e selvagem e o cálculo realizado como descrito no item 3.5.1.

Foi possível observar um melhor desempenho das plantas transformadas em relação à selvagem. As plantas transformadas apresentaram taxa de germinação que foi entre 9 a 55% maior que a taxa de germinação das plantas selvagens nas diferentes concentrações de NaCl (Figuras 8 e 9). As taxas superiores de germinação dos eventos transgênicos é um indício de que essas plantas apresentam uma maior tolerância ao sal independentemente da concentração utilizada.

Figura 8 – Taxa de germinação das plântulas WT e eventos transgênicos em diferentes concentrações de NaCl. * p valor menor que 0,05.



Fonte: Elaboração própria

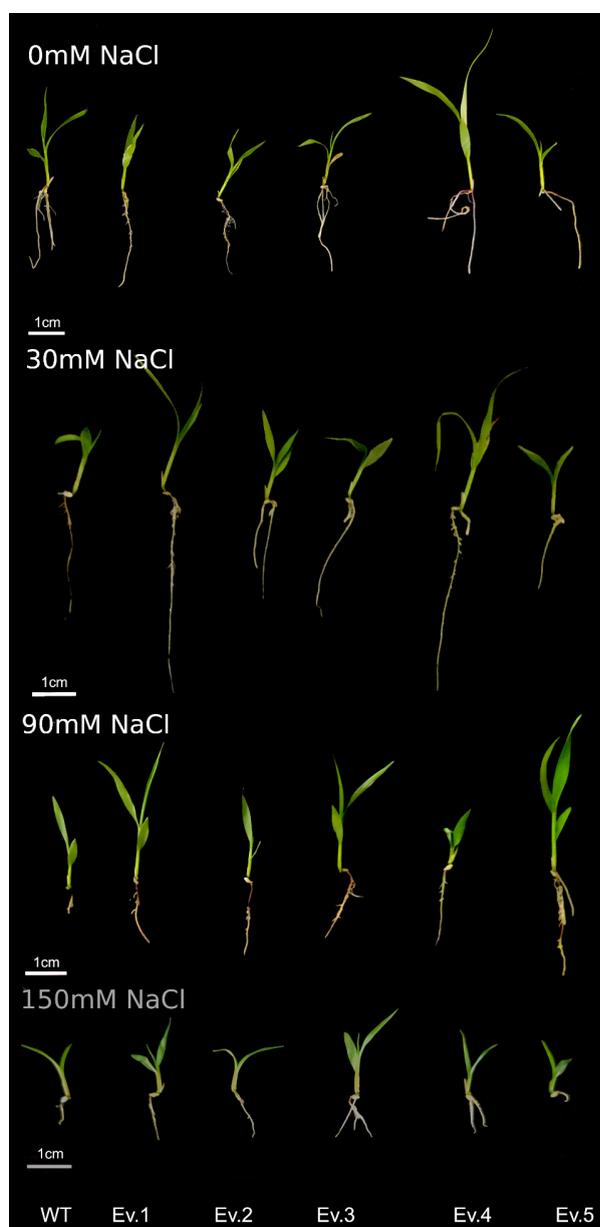
Figura 9 - Germinação de *Setaria viridis* em meio de cultura suplementado com NaCl

Fonte: Elaboração própria

4.5.2 Crescimento Radicular

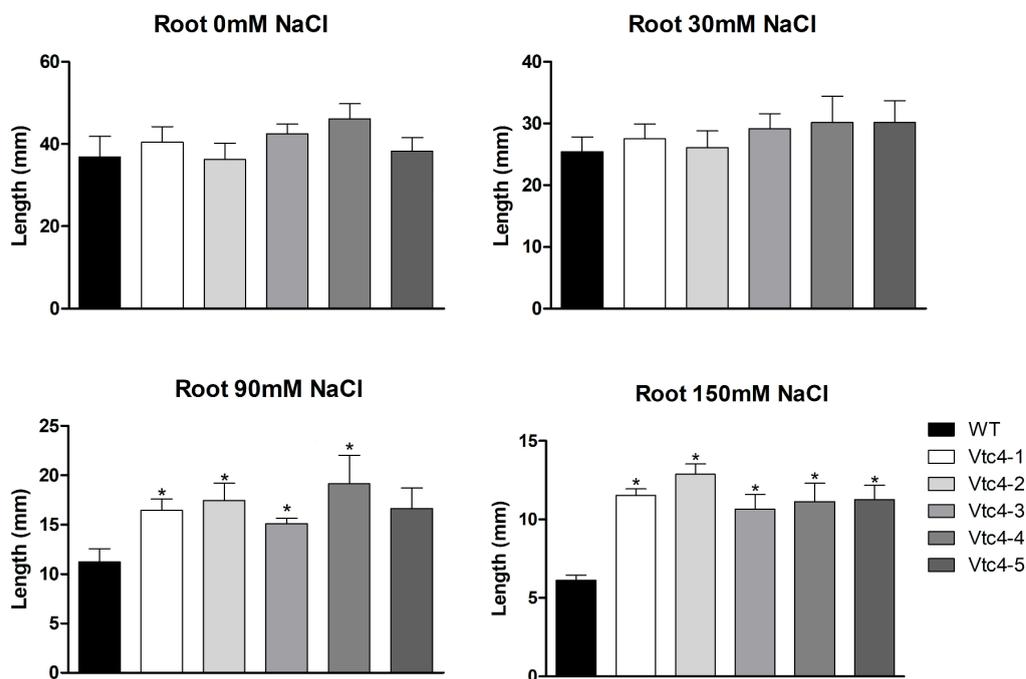
Os eventos foram germinados em placas de petri contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (0, 30, 90 e 150 mM). As plantas transformadas tiveram maior crescimento radicular (Figura 10 e 11), com diferença estatisticamente significativa nas condições de estresse de 90 mM de NaCl para os eventos 1, 2, 3 e 4 e para todos os eventos em 150 mM de NaCl.

Figura 10 - Raízes das plântulas de *S. viridis* selvagem e eventos superexpressando o gene da proteína CsVTC4 germinados em meio suplementado com 0, 30, 90 e 150 mmol/L de NaCl.



Fonte: Elaboração própria

Figura 11 - Comprimento da raiz das plântulas WT e eventos CsVTC4 em diferentes concentrações de NaCl. * *p*valor menor que 0,05.

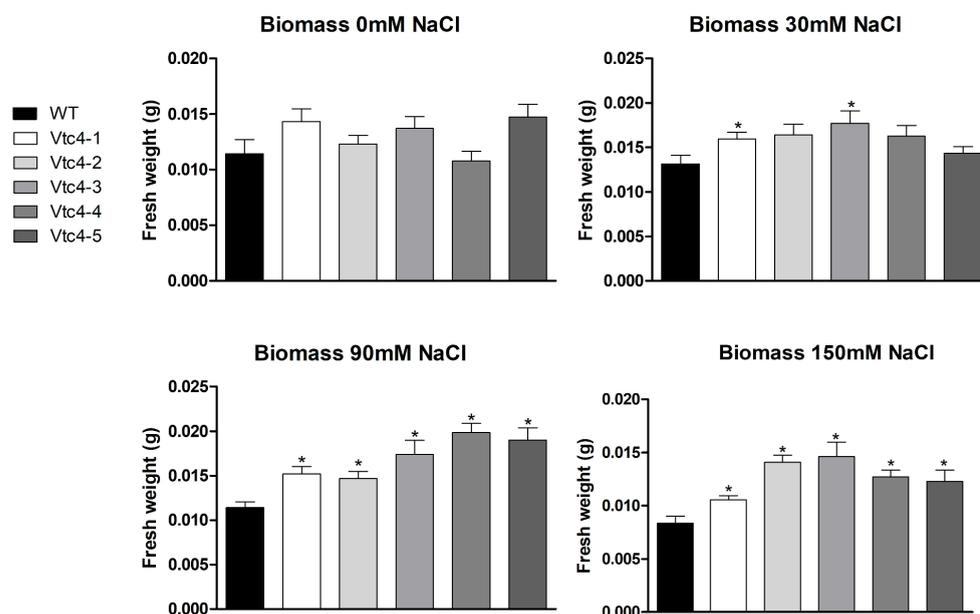


Fonte: Elaboração própria

4.5.3 Biomassa das plântulas

Todos os eventos transgênicos tiveram biomassa significativamente maior quando comparados às plântulas selvagens quando germinados em meio suplementado com 90 e 150 mM de NaCl. Os Eventos 1 e 3 apresentaram biomassa significativamente maior quando germinados no meio suplementado com 30 mM de NaCl.

Figura 12 - Peso das plântulas WT e CsVTC4 em diferentes concentrações de NaCl.
* pvalor menor que 0,05.



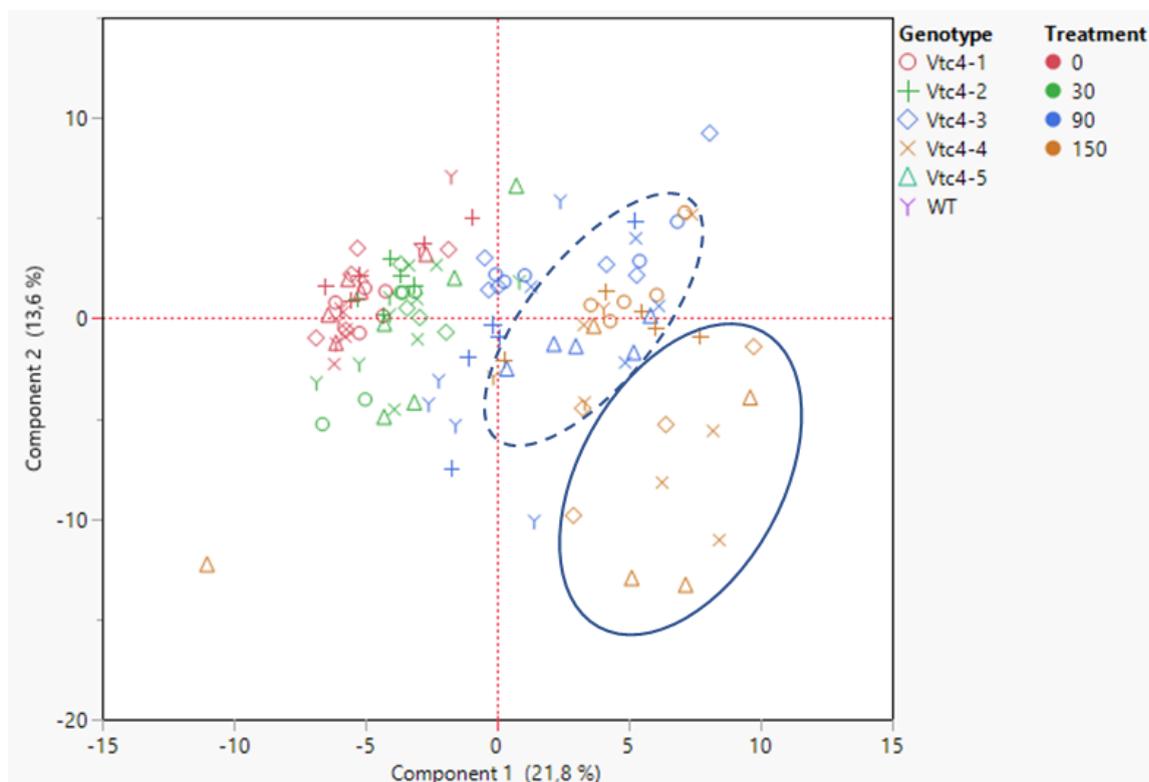
Fonte: Elaboração própria

4.6 Metabolômica

O perfil metabólico das plantas submetidas ao estresse salino de 90 e 150mM se distingue de maneira acentuada da condição de controle do que o perfil das plantas submetidas ao estresse menos severo, de 30mM. Apenas nas condições mais extremas o metabolismo da planta foi afetado, possivelmente porque a *S. viridis* é conhecida por ser uma espécie tolerante ao estresse osmótico (Kim *et al.*, 2004).

Por meio da análise de componentes principais (PCA) nota-se que entre 0 e 30 mM não há mudanças metabólicas significativas, enquanto a comparação entre os tratamentos 0, 90, 150 mM ocorre uma modulação maior do perfil metabólico. No tratamento 150 mM NaCl é possível realizar uma separação entre o perfil metabólico das plântulas wild-type, eventos 1 e 2 (elipse tracejada) e os eventos 3, 4 e 5 (elipse contínua) demonstrando que os últimos três eventos apresentam perfis metabólicos mais distintos de wild-type (Figura 13).

Figura 13 - Análise de componentes principais do perfil metabólico das plântulas transformadas e selvagens em diferentes concentrações de NaCl.



Fonte: Elaboração própria

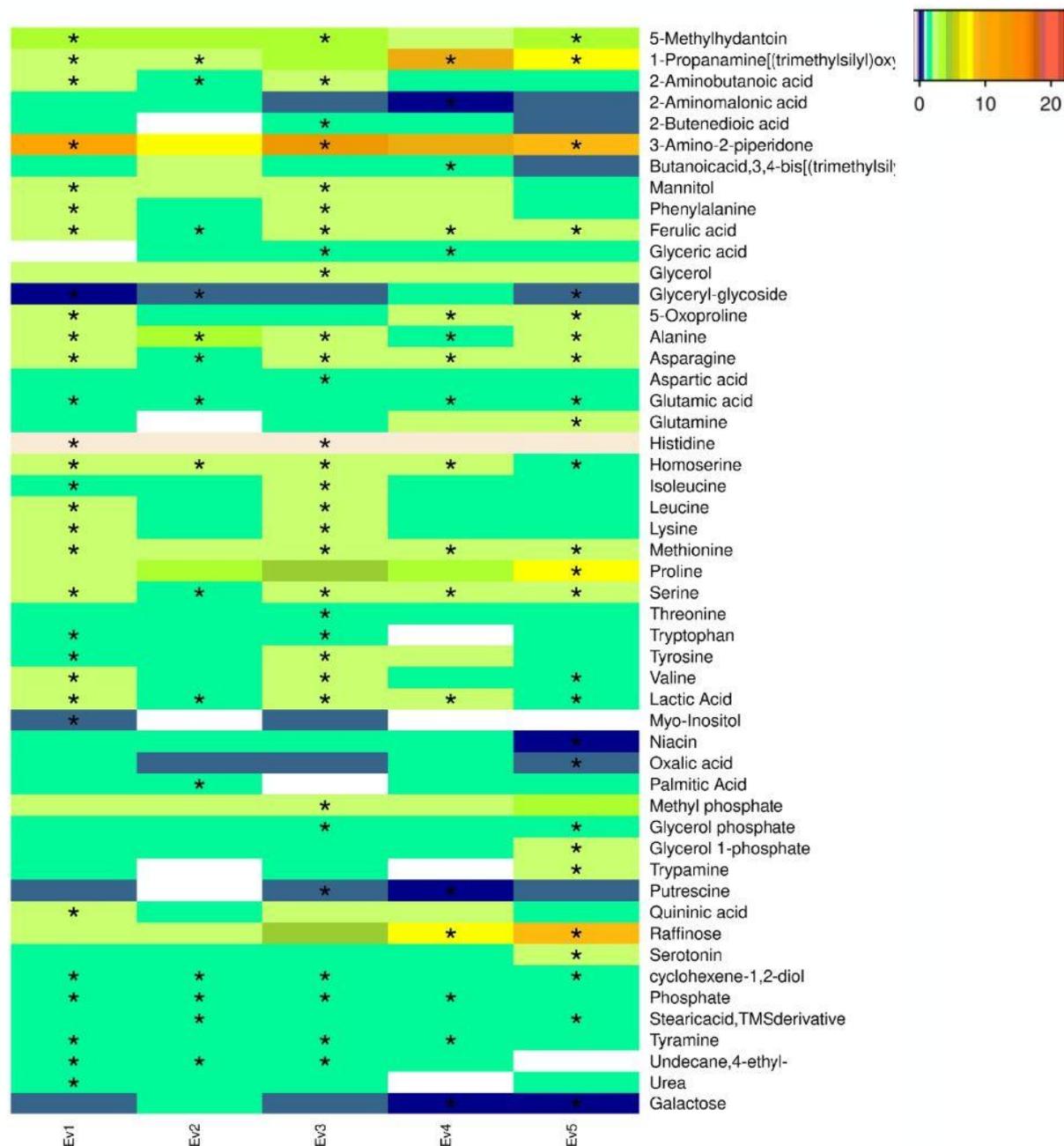
A análise por GC/MS permitiu a identificação de aproximadamente 90 metabólitos para as condições de estresse. Alguns metabólitos são significativamente acumulados em comparação às plantas selvagens em certas linhagens transgênicas mas não em todas, os resultados são apresentados usando a razão entre a concentração de metabólitos na linhagem transgênica e selvagem.

Para plantas transgênicas sob condições de controle observa-se um maior acúmulo de ácido cítrico, 1-propanamina[(trimetilsilil)oxi]propil], sorbitol e alanina e menor acúmulo de glutamina, ornitina, ácido pantotênico e RFOs em comparação com plantas selvagens. Em maiores concentrações de sal, o perfil metabólico foi diferente.

Em 90mM de NaCl foi observado maior número de metabólitos diferencialmente acumulados. Os aminoácidos foram a classe de metabólitos mais representativa acumulada nessa concentração, mas outras classes

também estão presentes, como açúcares, açúcares álcoois e ácidos orgânicos (Figura 14).

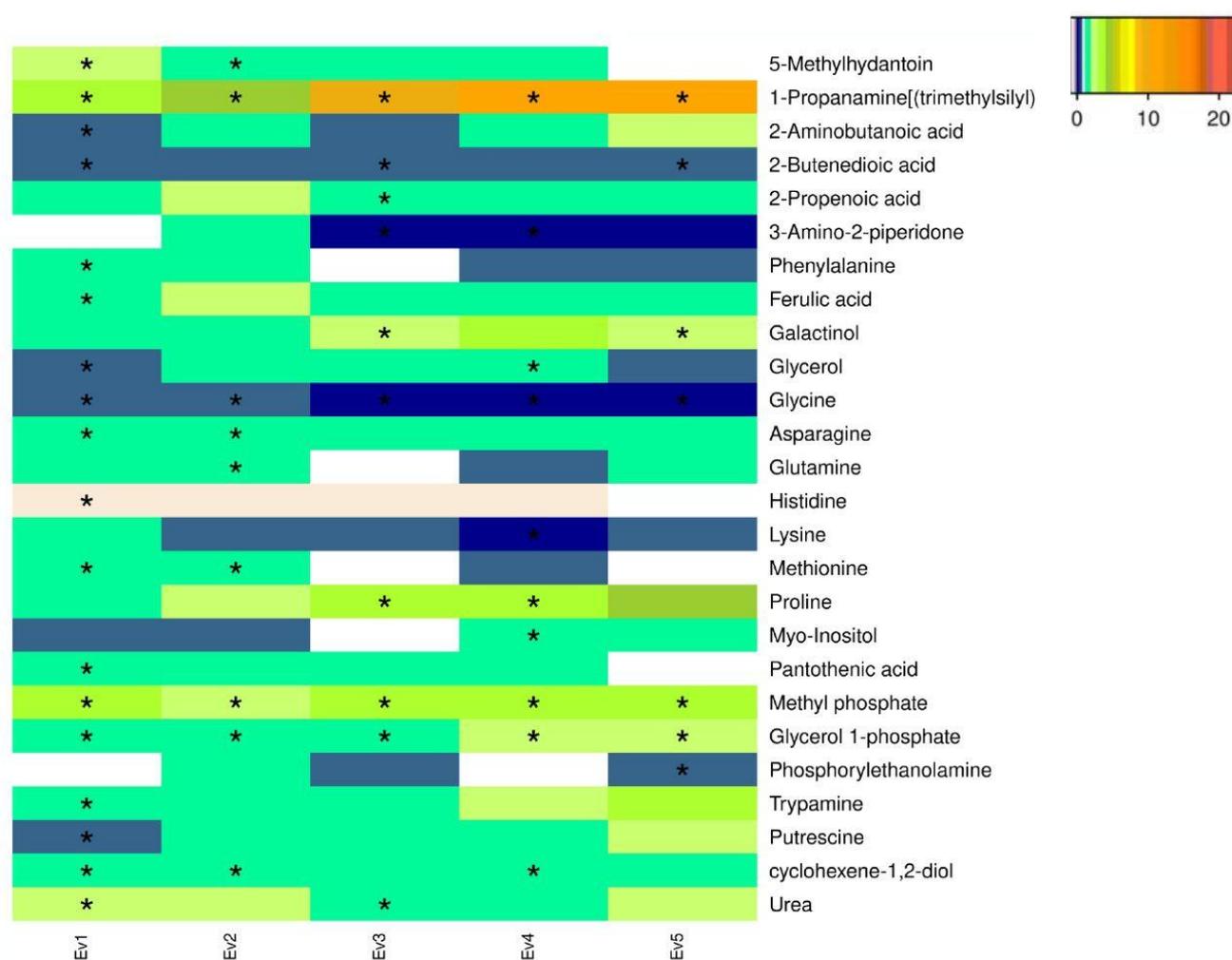
Figura 14 - Perfil metabólico de plântulas de cinco linhagens transgênicas de *Setaria viridis* comparado à linhagem selvagem com 10 dias de idade germinadas em meio suplementado com 90 mM de NaCl. Os valores representam a razão de cada evento dividido pelo valor da linhagem selvagem na respectiva condição de estresse. (*) $p < 0,05$ no teste t



Fonte: Elaboração própria

Quando submetidas a 150mM de NaCl, o acúmulo de metabólitos nas plântulas foi mais homogêneo entre as linhagens transgênicas, havendo acúmulo de 1-Propanamina[(trimetilsilil)oxi]propil], metil fosfato e glicerol 1-fosfato e diminuição nos níveis de glicina (Figura 15).

Figura 15 - Perfil metabólico de plântulas de cinco linhagens transgênicas de *Setaria viridis* comparado à linhagem selvagem com 10 dias de idade germinadas em meio suplementado com 150 mM de NaCl. Os valores representam a razão de cada evento dividido pelo valor da linhagem selvagem na respectiva condição de estresse. (*) $p < 0,05$ no teste t



Fonte: Elaboração própria

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio das análises *in silico* o gene da *CsVTC4* foi avaliado e sua sequência foi identificada. Concluiu-se que a sequência proveniente da alga *Coccomyxa* apresenta distância filogenética em relação ao mesmo gene de *Setaria viridis*, tendo identidade de 54,17%.

Onze eventos transgênicos superexpressando o gene de interesse foram confirmados por PCR, dos quais cinco que apresentavam inserção única do gene foram cultivados até atingir a homozigose. Estes eventos apresentaram diferentes níveis de expressão relativa da *CsVTC4*.

As plântulas transgênicas de *Setaria viridis* superexpressando o gene *CsVTC4* apresentaram uma melhora nos parâmetros de germinação, crescimento radicular e acúmulo de biomassa quando submetidas à condições de estresse salino.

O melhor desempenho dessas plântulas pode estar relacionado a alterações do metabolismo, considerando o acúmulo de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares álcoois visto nos eventos transformados. O acúmulo desses metabólitos reforça a capacidade de osmoproteção e leva a menor dano celular.

6. CONCLUSÃO

Os resultados analisados até o momento sugerem que a superexpressão do gene *CsVTC4* gera plântulas que possuem como característica maior tolerância ao estresse salino em *Setaria viridis*.

Sendo assim, a inserção de genes relacionados com a síntese de mio-inositol pode ser uma alternativa promissora para a criação de linhagens resistentes a estresses osmóticos em plantas com metabolismo C4, que são de interesse energético.

A fim de corroborar com os dados obtidos, os mesmos eventos deste estudo serão analisados em plantas adultas. Ademais, visando elucidar os possíveis mecanismos de ativação que promovam tal tolerância, novos experimentos serão conduzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISIMOVA, Maria; GASCUEL, Olivier. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology*, v. 55, n. 4, p. 539-552, 2006.

BENNETZEN, Jeffrey L. *et al.* Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature biotechnology*, v. 30, n. 6, p. 555-561, 2012.

BOEHM, C. R.; BOCK, R. Recent advances and current challenges in synthetic biology of the plastid genetic system and metabolism. *Plant physiology*. 2019.

BRUTNELL, Thomas P. *et al.* *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. *The Plant Cell*, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.

CARR, A. C.; MAGGINI, S. Vitamin C and immune function. *Nutrients*, v. 9, n. 11, p. 1211, 2017.

CENTENO, D. C. *et al.* Contrasting strategies used by lichen microalgae to cope with desiccation–rehydration stress revealed by metabolite profiling and cell wall analysis. *Environmental microbiology*, v. 18, n. 5, p. 1546-1560, 2016.

CHEVENET, F. *et al.* TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2006.

COELHO, C.; HUANG, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* as a model for C4 photosynthesis. *Genomics and genetics: crops and models*. New York: Springer, 2017.

COHEN, J. D. e BANDURSKI, R. S. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 33, n. 1, p. 403-430, 1982.

CONKLIN, P. L. *et al.* *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 15662-15670, 2006.

DAI, A. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature climate change*. 2013.

DATTA, A. Genetic engineering for improving quality and productivity of crops. *Agriculture & Food Security*. 2013.

DEREEPER, A. *et al.* Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, v. 36, n. suppl_2, p. W465-W469, 2008.

DIAS, H. F; SENTELHAS, P. C. Dimensioning the impact of irrigation on sugarcane yield in Brazil. *Sugar Tech*. 2019.

DOUST, A. N. *et al.* Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. *Plant physiology*, v. 149, n. 1, p. 137-141, 2009.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 1987.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EPA – U. S. Environmental Protection Agency. Global Greenhouse Gas Emissions Data. 2021. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>>.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Mapping of salt-affected soils. Technical specifications and country guidelines. Rome, 2020.

FARGIONE, J. *et al.* Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science*. 2008.

GILBERT, M, E; MEDINA, V. Drought adaptation mechanisms should guide experimental design. *Trends in plant science*. 2016.

GOLDEMBERG, J; COELHO, S. T; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy policy*. 2008.

GOODSTEIN, David M. *et al.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, v. 40, n. D1, p. D1178-D1186, 2012.

GUINDON, Stéphane; GASCUEL, Olivier. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.

HELL, A. F. *et al.* Polyols-related gene expression is affected by cyclic desiccation in lichen microalgae. *Environmental and Experimental Botany*, v. 185, p. 104397, 2021.

HICKEY, L. T. *et al.* Breeding crops to feed 10 billion. *Nature biotechnology*. 2019.

HU, L. *et al.* Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple. *Horticulture research*, v. 7, 2020.

IEA - International Energy Agency. *Renewables 2021*, IEA, Paris, 2021. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/renewables-2021>>.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change [PÖRTNER, Hans O. *et al.*] *Climate change 2022: impacts, adaptation and vulnerability*. 2022.

KANAYAMA, Y. Physiological roles of polyols in horticultural crops. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, v. 78, n. 2, p. 158-168, 2009.

KARNAUSKAS, Kristopher B.; MILLER, Shelly L.; SCHAPIRO, Anna C. Fossil fuel combustion is driving indoor CO₂ toward levels harmful to human cognition. *GeoHealth*, v. 4, n. 5, 2020.

KELLOGG, Elizabeth A. *Evolution of Setaria*. In: *Genetics and genomics of Setaria*. Springer, Cham, 2017.

KHURANA, N. e CHAUHAN, H. e KHURANA, P. Expression analysis of a heat-inducible, Myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS) gene from wheat and the alternatively spliced variants of rice and *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, v. 31, n. 1, p. 237-251, 2012.

KIM, Y. *et al.* Antioxidative responses and their relation to salt tolerance in *Echinochloa oryzicola* Vasing and *Setaria viridis* (L.) Beauv. *Plant growth regulation*, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2004.

LAING, W. A. *et al.* A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 48, p. 16976-16981, 2004.

LESK, C; ROWHANI, P; RAMANKUTTY, N. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*. 2016.

LI, Z. *et al.* Myo-inositol enhances drought tolerance in creeping bentgrass through alteration of osmotic adjustment, photosynthesis, and antioxidant defense. *Crop Science*. 2020.

LING-YU, H. U. *et al.* Overexpression of MdMIPS1 enhances drought tolerance and water-use efficiency in apple. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022.

LISKO, K. A. *et al.* Engineering elevated vitamin C in plants to improve their nutritional content, growth, and tolerance to abiotic stress. *Phytochemicals—Biosynthesis, Function and Application*, p. 109-128, 2014.

LOEWUS, F. A. e MURTHY, P. P. N. Myo-Inositol metabolism in plants. *Plant science*, v. 150, n. 1, p. 1-19, 2000.

MACEDO, I. C. *et al.* A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. São Paulo: UNICA, 2005.

MARTINS, P. K. *et al.* A simple and highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. *Biotechnology reports*, v. 6, p. 41-44, 2015.

MARTINS, P. K. *et al.* Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA BRASIL. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2019. 1 ed. Rio de Janeiro: ANP, 2019.

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, BRASIL. Resenha energética brasileira. Brasília, 2021.

MULLER, P. Y. *et al.* Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT PCR (vol 32, pg 1378, 2002). *Biotechniques*, v. 33, n. 3, p. 514-514, 2002.

NELSON, D. E; RAMMESMAYER, G. e BOHNERT, H. J. Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *The Plant Cell*, v. 10, n. 5, p. 753-764, 1998.

NELSON, D. E; KOUKOUMANOS, M. e BOHNERT, H. J. Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant physiology*, v. 119, n. 1, p. 165-172, 1999.

NISHIZAWA-YOKOI A; YABUTA, Y. e SHIGEOKA, S. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant signaling & behavior*, v. 3, n. 11, p. 1016-1018, 2008.

NOIRAUD, N; MAUROUSSET, L; LEMOINE, R. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001.

PFAFFL, M. W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

QUADRELLI, R; PETERSON, S. The energy–climate challenge: Recent trends in CO2 emissions from fuel combustion, *Energy Policy*. 2007.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RODRÍGUEZ L. D. *et al.* Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*. 2017.

SAA SP - SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO SÃO PAULO. Cana-de-açúcar: produção e processamento em 2019. São Paulo, 2020. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14767>>.

SMIRNOFF, N. e CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, v. 28, n. 4, p. 1057-1060, 1989.

SOUSA, E. L. L. *et al.* Ethanol and bioelectricity : sugarcane in the future of the energy matrix. 1 ed. São Paulo : UNICA, 2011.

TÁVORA, F. L. História e economia dos biocombustíveis no Brasil. Brasília: Senado Federal, 2011.

TORABINEJAD, J. *et al.* VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant physiology*, v. 150, n. 2, p. 951-961, 2009.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Safra 2021/2022 processa 523 milhões de toneladas de cana. Notícias. 2022. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/safra-2021-2022-processa-523-milhoes-de-toneladas-d-e-cana/>>.

VALLURU, R. e VAN DEN ENDE, W. Myo-inositol and beyond–emerging networks under stress. *Plant science*, v. 181, n. 4, p. 387-400, 2011.

VIEIRA, C. M. D. S. *et al.* Avaliação da extensão das áreas afetadas por saís: Nordeste, Brasil e mundo. CONIDIS. Campina Grande: Realize Editora, 2016.

WANG, L. *et al.* Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014.

YU, W. *et al.* MCK1 is a novel regulator of myo-inositol phosphate synthase (MIPS) that is required for inhibition of inositol synthesis by the mood stabilizer valproate. *PLoS one*, v. 12, n. 8. 2017.

ZHAI, H. *et al.* A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, Ib MIPS 1, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. *Plant Biotechnology Journal*, v. 14, n. 2, p. 592-602, 2016.

APÊNDICE A

>D949 p6oAct-UbiZm-CsVTC4

ATGGGCGCCACCGAGGGTCCCGGAGACAAGCCTATCGATAACGGCACTCGCGGGA
TGGAGGACTACCTCAGGGTCGCTCTGCTCGCCGCGAAGCAGGCCGGCATTGTGGA
TTTGGTCACCGAGACCGACAAGAAGTGCGAGGAGATCATCTTCTCCAGCATTTCGT
GACGCTTTCCAGATCACAAGTTCATCGGGGAGGAGGACTCTGCAGCCCAGGGCT
TCACAGCTGATCTGACCGACAACCCGACCTGGATGGTGGACCCCGTTGATGGAAC
TACCAACTTCGTCCATCGCTTCCCTTTCGTGTGCGTCTGCATCGGGCTCGCCATAGA
CAAGAAAGTGGCCGTCGGCGTAGTGTACAATCCCATCCTTGATGAGCTGTACACGG
CCATGAGGGGTAAGGGCGCGTTCCTCAACGGCCAGCCAATTAACGTCTCCGGATG
CACCGACCTCGGTAGCGCCCTGATCATCACCGAGATCGGGGTTACTCGTGATGACG
CCACCCTCGACGCTCTGTTCGGCCGGATTTCCGCAATCGTCAAGGGCGCCCGCAG
CGTGCGTTGCATGGGTTCCCTGCGCTTTGGATATGTGCTCGGTCGCCTGCGGCAGGG
CCGAAGTGAGTTATGAAGTCGGATTCGGCGGTCCGTGGGACGTGGCGGCTGCCTC
CCTCATCGTCGAGGAGGCCGGTGGCCACGTTGCTGATCCCGCCGGAGGCCCTTTC
GACATTATGGGGCGCAGGGTGCTTGCAGCTAGCAACGCCGGTCTGGTCGAGCAGG
TGGCGGCTCTCATCGCTCCCCTGCCACTCGGCCC GAAGGAGCCTCAGCCCTCAGC
CGTCAGCTAA