



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

ISABELA DE MELO ACETO

**SUPEREXPRESSÃO DO GENE VTC4 PARA MITIGAÇÃO DE ESTRESSE
OSMÓTICO EM *Setaria viridis***

SANTO ANDRÉ

2025

ISABELA DE MELO ACETO

**SUPEREXPRESSÃO DO GENE VTC4 PARA MITIGAÇÃO DE ESTRESSE
OSMÓTICO EM *Setaria viridis***

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biotecnologia, Pró-reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal do ABC - UFABC, como requisito para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo da Cruz Centeno.

Coorientadora: Dra. Karoline Estefani Duarte.

SANTO ANDRÉ

2025

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de dissertação de mestrado da aluna ISABELA DE MELO ACETO, realizada em 13 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo da Cruz Centeno

Prof^a. Dr. Wagner Rodrigo de Sousa

PhD. Rodrigo Sanchez

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, familiares e amigos que sempre me apoiam, me dando forças nos momentos difíceis e tornando a vida mais leve.

A todos os professores da UFABC que me incentivam a buscar conhecimento e me inspiraram, principalmente ao meu orientador, professor Danilo Centeno.

Agradecimentos especiais à minha coorientadora Karoline, que sempre acreditou em mim e me apoiou durante o desenvolvimento do projeto.

A todos os colegas de laboratório pelo apoio e parceria.

Ao Programa de Recursos Humanos da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP pelo apoio financeiro e a todos os participantes do PRH 49.

À Universidade Federal do ABC e a todos os seus servidores e terceirizados que cuidam desse espaço que tem sido minha segunda casa.

RESUMO

Os biocombustíveis desempenham um papel crucial na transição global para energias sustentáveis, mas, o desmatamento para a produção de biomassa agrava a problemática das mudanças climáticas. Assim, é imperativo a prática agrícola de menor impacto, com o uso eficiente de recursos hídricos e a conservação do solo, a fim de que a produção bioenergética não degrade o meio ambiente. A engenharia genética emerge como ferramenta para aumentar a produtividade das culturas, podendo auxiliar a desenvolver plantas com características desejáveis e impedir o avanço do desmatamento para aumento da área plantada. A integração da biotecnologia com práticas agrícolas sustentáveis é um caminho promissor para atender à demanda energética global de maneira sustentável, garantindo que a produção de biocombustíveis siga contribuindo para a preservação ambiental. Os polióis desempenham um papel crucial na fisiologia das plantas, especialmente na resposta a condições de estresse ambiental, protegendo as células vegetais contra danos causados durante o estresse. Assim, a presença e acúmulo de polióis promovem a resiliência e a sobrevivência das plantas em ambientes desafiadores, aumentando a produtividade em circunstâncias desfavoráveis. O mio-inositol é um poliol que atua como precursor para diversos metabólitos relacionados com proteção a estresse. A L-galactose 1-fosfato fosfatase (VTC4) é uma enzima que age nas vias de síntese de mio-inositol e do ascorbato. Este estudo pretende aumentar a tolerância a estresses osmóticos na planta modelo de metabolismo fotossintético C₄, *S. viridis*, através da superexpressão do gene VTC4. Os resultados obtidos indicaram que a superexpressão desse gene gerou plântulas de *S. viridis* mais tolerantes ao estresse salino e plantas com melhores parâmetros de trocas gasosas, mas sem promover aumento de produtividade. Portanto, a inserção de genes da via do mio-inositol pode ser um caminho para a criação de linhagens tolerantes a estresses osmóticos em plantas de interesse energético, mas ainda são necessários estudos que levem esse aumento de tolerância a refletir em aumento de produtividade.

Palavras-chave: biocombustíveis; melhoramento genético; mio-inositol; gramíneas; VTC4.

ABSTRACT

Biofuels play a crucial role in the global transition to sustainable energy sources. However, deforestation for biomass production exacerbates climate change issues. Therefore, it is essential to adopt low-impact agricultural practices, efficient water resource use, and soil conservation to ensure that bioenergy production does not negatively impact the environment. Genetic engineering emerges as a tool to increase crop productivity by developing plants with desirable traits, thereby preventing deforestation for expanding planted areas. Integrating biotechnology with sustainable agricultural practices is a promising approach to meet global energy demands sustainably, ensuring that biofuel production continues to contribute to environmental preservation. Polyols play a crucial role in plant physiology, particularly in response to environmental stress conditions, by protecting plant cells from damage during stress. Thus, the presence and accumulation of polyols are essential for the resilience and survival of plants in challenging environments, promoting growth and productivity under unfavorable conditions. Myo-inositol is a polyol that acts as a precursor for various stress-protective metabolites. L-galactose-1-phosphate phosphatase is an enzyme involved in the synthesis pathways of myo-inositol and ascorbate. This study aims to increase osmotic stress tolerance in the C4 photosynthetic metabolism model plant, *S. viridis*, through the overexpression of the VTC4 gene. The results indicated that the overexpression of this gene produced *S. viridis* seedlings more tolerant to salt stress and plants with better photosynthetic parameters, but without promoting increased productivity in plants. Therefore, the insertion of genes from the myo-inositol pathway may be an option to create osmotic stress-tolerant lines in energy crops, but further studies are needed to turn this increased tolerance into increased productivity.

Keywords: biofuels; genetic improvement; myo-inositol; grasses; VTC4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Funcionalidades do mio-inositol no metabolismo vegetal.....	19
Figura 2 – Via do metabolismo do inositol fosfato em <i>Setaria viridis</i>	22
Figura 3 – Via do metabolismo do ascorbato em <i>Setaria viridis</i>	23
Figura 4 - Mapa do vetor binário utilizado para transformação de plantas de <i>Setaria viridis</i> mediada por <i>Agrobacterium</i>	31
Figura 5 - Etapas do protocolo de transformação genética de <i>S. viridis</i>	33
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 com o gene <i>CsVTC4</i>	40
Figura 7 - Expressão relativa usando RT-qPCR para eventos transgênicos superexpressando o gene <i>CsVTC4</i> em <i>Setaria viridis</i>	41
Figura 8 – Taxa de germinação das plântulas de <i>Setaria viridis</i> em diferentes concentrações de NaCl.....	42
Figura 9 - Germinação de sementes de <i>Setaria viridis</i> em meio de cultura suplementado com NaCl.....	43
Figura 10 - Raízes das plântulas de <i>S. viridis</i> germinadas em meio suplementado com NaCl..	44
Figura 11 - Peso fresco das plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em diferentes concentrações de NaCl.....	45
Figura 12 - Peso seco da parte aérea de plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas sob condições de estresse osmótico.....	46
Figura 13 - Polióis totais em plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em diferentes concentrações de sal.....	47
Figura 14 - Polióis totais em plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em condição de controle e estresse osmótico.....	47
Figura 15 - PCA do perfil metabólico das plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em diferentes concentrações de NaCl.....	48
Figura 16 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em diferentes concentrações de NaCl.....	49
Figura 17 - Perfil metabólico na condição de controle de plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio de desenvolvimento de <i>Setaria viridis</i>	51
Figura 18 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em condição controle.....	52
Figura 19 - Perfil metabólico de plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio suplementado com 30mM de NaCl.....	53
Figura 20 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio suplementado com 30 mM de NaCl.....	54
Figura 21 - Perfil metabólico de plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio suplementado com 90mM de NaCl.....	55
Figura 22 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio suplementado com 90 mM de NaCl.....	56
Figura 23 - Perfil metabólico de plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio suplementado com 150mM de NaCl.....	58
Figura 24 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de <i>Setaria viridis</i> germinadas em meio suplementado com 150 mM de NaCl.....	59

Figura 25 - PCA do perfil metabólico das plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em diferentes concentrações regimes de estresse osmótico.....	61
Figura 26 - Perfil metabólico de plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo na condição de controle.....	63
Figura 27 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo sob condição controle.....	64
Figura 28 - Perfil metabólico de plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo na condição de estresse hídrico.....	65
Figura 29 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo sob condição de estresse hídrico.....	66
Figura 30 - Perfil metabólico de plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo 24 horas após recuperação estresse hídrico.....	68
Figura 31 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo 24 horas após recuperação estresse hídrico.....	69
Figura 32 - Perfil metabólico de plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo na condição de estresse salino.....	70
Figura 33 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de <i>Setaria viridis</i> cultivadas em solo após estresse salino.....	71
Figura 34 - Trocas gasosas das folhas em <i>Setaria viridis</i> em condição de controle e de estresse hídrico.....	74
Figura 35 - Trocas gasosas das folhas em <i>Setaria viridis</i> 24H após recuperação do estresse hídrico.....	75
Figura 36 - Trocas gasosas das folhas de <i>Setaria viridis</i> durante estresse salino.....	76
Figura 37 – Via do metabolismo de interconversão de glucoronato e pentose em <i>Setaria viridis</i>	79
Figura 38 - Via do metabolismo galactose em <i>Setaria viridis</i>	80
Figura 39 - Via do metabolismo da frutose e manose em <i>Setaria viridis</i>	81
Figura 40 - Síntese de galactinol e rafinose a partir de mio-inositol.....	83
Figura 41 - Potenciais mecanismos de reação da prolina com ROS.....	84

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Alteração da concentração de MI e de compostos relacionados com a via da VTC4 identificados na análise metabólica de plântulas.....	59
Tabela 2 - Alteração da concentração de MI e de compostos relacionados com a via da VTC4 identificados na análise metabólica de plantas.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Assimilação líquida do carbono
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
BSTFA - N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar
Ci - Concentração de CO₂ intracelular
CIM - Meio de indução de calos
CO₂ - Dióxido de Carbono
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
CRED - Centro de Pesquisa na Epidemiologia dos Desastres
CsVTC4 - L-galactose-1-fosfato fosfatase de *Coccomyxa subellipsoidea*
CTAB - Brometo de cetiltrimetilamonio
DFFF - Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos
D/R - Dessecação/Reidratação
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DNAg - Ácido Desoxirribonucleico genômico
E - Evapotranspiração
EPE - Empresa de Pesquisa Energética
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
G6P - Glicose-6-Fosfato
GA - Ácido Giberélico
GC - Cromatografia gasosa
GC/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GEE - Gases de Efeito Estufa
GHG - Greenhouse Gases
Gs - Condutância estomática
IAA - Ácido indolacético
IEA - Agência Internacional de Energia
IMP - Inositol Monofosfatase
IMPL - Inositol Monofosfatase Like
IPCC - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
IRGA - Analisador de gases por infravermelho
L-Gal 1-P - L-galactose-1-fosfato

LB - Luria Bertani

MCA - Metanol:clorofórmio:água

MI - Mio-inositol

MiPP1 -Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 gene

MiPP2 - Multiple inositol polyphosphate phosphatase 2 gene

MIPS - Mio-inositol-1-fosfato sintase

MIOX - Mio-inositol Oxigenase

MRS - Meio de regeneração de *Setaria*

MS - Murashige & Skoog

Na - Sódio

NaCl - Cloreto de Sódio

NT - Não transformadas

O₂ - Oxigênio

OD₆₀₀ - Densidade óptica medida em comprimento de onda de 600 nanômetros

PCA - Análise de componentes principais

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PEP - Fosfoenol piruvato

PFAM - Base de dados de famílias de proteínas

PIB - Produto interno bruto

PLS-DA - Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais

Proálcool - Programa Nacional do Alcool

RFOs - Oligossacarídeos da família da rafinose

RFA - Associação de Combustíveis Renováveis dos Estados Unidos

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

RuBisCO - Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase

SE - *Standard Error*

VTC4 - L-galactose-1-fosfato fosfatase

WT - Wild type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Contextualização.....	13
1.2. Mio-inositol.....	17
1.3. A L-galactose 1-fosfato fosfatase (VTC4).....	20
1.4. O metabolismo C4.....	24
1.5. <i>Setaria viridis</i>	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. Análises <i>in silico</i> e construção do vetor.....	30
4.2. Transformação Genética e análises moleculares.....	31
4.3. Aplicação de estresse em plântulas.....	34
4.4. Aplicação de estresse em solo em plantas.....	34
4.5. Análises Biométricas.....	35
4.5.1. Taxa de Germinação.....	35
4.5.2. Crescimento Radicular.....	35
4.5.3. Biomassa das plântulas.....	35
4.5.4. Biomassa das plantas.....	36
4.6. Quantificação de polióis totais.....	36
4.7. Metabolômica.....	36
4.8. Análises de trocas gasosas.....	38
4.9. Análise Estatística.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Análises <i>in silico</i>	39
5.2. Transformação genética.....	39
5.3. Aplicação de estresse em plântulas.....	40
5.4. Análises biométricas.....	41
5.4.1. Taxa de Germinação.....	41
5.4.2. Crescimento Radicular e da Parte Aérea de Plântulas.....	42
5.4.3. Biomassa Plântulas.....	44
5.4.4. Biomassa das plantas.....	44
5.5. Quantificação de polióis totais.....	45
5.5.1. Plântulas.....	45
5.5.2. Plantas.....	46
5.6. Metabolômica.....	47
5.6.1. Plântulas.....	47
5.6.2. Plantas.....	59
5.7. Análises de trocas gasosas.....	72
6. DISCUSSÃO.....	76

7. CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE A.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

Nos últimos anos, eventos de seca e altas temperaturas tornaram-se cada vez mais frequentes em todo o planeta. No Brasil não é diferente, todas as regiões, exceto a região Sul, apresentaram as secas mais intensas e severas dos últimos 60 anos, entre 2011 e 2019. Na região Sudeste ocorreu a seca de maior intensidade no Brasil dentro do mesmo período, o que levou a uma crise de abastecimento de água e de geração de energia hidroelétrica em 2014 (Cunha *et al.*, 2019).

A estiagem traz consigo diversos impactos socioeconômicos, como aumento da insegurança alimentar, diminuição da disponibilidade de água, problemas de saúde e também afeta a produção energética. Esse último ponto merece atenção principalmente no Brasil, onde 27,9% da oferta interna de energia depende diretamente de recursos hídricos. Isso porque 12,5% da oferta de energia interna vem de fonte hidráulica e 15,4% de biomassa de cana (EPE, 2023), uma cultura que depende dos índices pluviométricos para se desenvolver com qualidade.

Já no âmbito econômico, a seca é o desastre natural que causa maiores perdas para os países, sendo que 40% dos eventos de seca estudados pelo recorte do Centro de Pesquisa na Epidemiologia dos Desastres (CRED) causaram um impacto maior que 0,5% no PIB dos países afetados (Guha-Sapir, *et al.*, 2013).

Na agricultura, a seca foi identificada como a principal causa da diminuição de produção, sendo responsável por 34% das perdas na agropecuária em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que entre 2008 e 2018, estiagens resultaram em prejuízos de cerca de US\$ 37 bilhões para o setor (FAO, 2021).

Com o claro agravamento das consequências dos desastres climáticos, as percepções sociais sobre esses eventos vêm sendo estudadas, notando-se uma crescente consciência e preocupação com os efeitos das mudanças climáticas na sociedade.

No presente, a responsabilização dessas mudanças a fatores antropogênicos é inequívoca. A detecção de mudanças específicas no clima e seus diversos impactos nas pessoas e na natureza está avançando, com uma atribuição robusta das mudanças climáticas às emissões de gases de efeito estufa (GEE) e, mais especificamente no Brasil, às mudanças no uso da terra, que incluem o

desmatamento de florestas nativas. Além disso, as capacidades científicas para atribuir eventos climáticos e meteorológicos às emissões de GEE evoluíram e se tornaram padrão ao longo das últimas três décadas. Essa evolução tem permitido uma compreensão mais clara das ligações entre atividades humanas e eventos climáticos extremos (IPCC, 2022).

Ao quantificar as emissões antropogênicas dos GEE, nota-se que o uso de combustíveis fósseis é o principal contribuinte, sendo responsável por 78% do aumento das emissões no período compreendido entre 1970 e 2011 (Quadrelli; Peterson, 2007).

As projeções indicam que as emissões futuras de CO₂, oriundas apenas da infraestrutura existente de combustíveis fósseis, já superam o limite máximo de emissões necessário para restringir o aquecimento global a 1,5 °C acima dos níveis pré-industriais (IPCC, 2022), conforme estabelecido pelo Acordo de Paris.

Logo, torna-se evidente a necessidade de redução dessa infraestrutura. Um possível caminho para atingir esse objetivo é o uso de combustíveis alternativos, como os biocombustíveis. Gramíneas de metabolismo C₄, como o milho e a cana-de-açúcar, vêm ganhando atenção para a produção de biocombustíveis, como o etanol, principalmente nos Estados Unidos e no Brasil, países que juntos são responsáveis por 80% da produção mundial de etanol (RFA, 2024).

Entre as vantagens do etanol estão balanço energético e de emissão de GEE favorável em sua produção (Sousa *et al.*, 2011), redução de emissão de gases nocivos à saúde quando comparado ao uso de gasolina e outros combustíveis fósseis (Goldemberg *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014) e diminuição da dependência do petróleo e do impacto da flutuação do preço de combustíveis fósseis, trazendo maior segurança energética para o país.

Estima-se que entre 2000 e 2011, o uso de biocombustíveis no Brasil tenha evitado a emissão de 310 milhões de toneladas de CO₂ e entre 2003 e 2021 o uso de etanol no Brasil tenha evitado a emissão de 526 milhões de toneladas de CO₂ quando comparado ao uso de gasolina e diesel (UNICA, 2023; Gazzoni, 2014).

Devido suas diversas vantagens e alinhamento com a busca por fontes de energia mais limpas, espera-se que a demanda global de biocombustíveis cresça mais de 30 bilhões de litros, ou 23%, entre 2022 e 2028, segundo estudo realizado pela agência internacional de energia (IEA), sendo o etanol e o diesel renovável

responsáveis por dois terços desse aumento e biodiesel e o bioquerosene pelo restante (IEA, 2022).

Assim, o aumento da produção de biocombustíveis é de interesse mundial e um pilar central para atingir a sustentabilidade do setor energético e de transporte, que ainda depende de combustíveis fósseis líquidos.

Um grande desafio é evitar a expansão das áreas agricultáveis para suprir essa demanda. O aumento das temperaturas e secas recentes já forçaram 28% das terras agrícolas brasileiras para fora de suas condições climáticas ideais. Projeta-se que 51% da agricultura da região sairá de condições climáticas ideais até 2030 e 74% até 2060, uma parte fundamental para estabilizar o clima regional e mitigar esse problema é proteger a vegetação nativa (Rattis *et al.*, 2021).

Logo, a introdução de culturas visando a produção de etanol e outros biocombustíveis em locais com vegetação nativa é uma opção inviável, que pode emitir de 17 a 420 vezes mais GEE do que seria evitado pela substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis. Em comparação, o uso de terras abandonadas ou degradadas emerge como uma opção que gera pouca ou nenhuma dívida de carbono (Fargione *et al.*, 2008).

Os solos salinos são um exemplo de área degradada. Nesses locais, a troca de água e nutrientes entre o solo e a planta é limitada, devido ao forte potencial osmótico negativo do solo, o que pode levar à perda de produtividade agrícola (FAO, 2020). Diariamente, 2000 hectares de terras aráveis são perdidos devido à salinização. Esse fenômeno pode afetar a produtividade de algumas culturas em 10 a 25% e até impedir totalmente o cultivo, levando à desertificação da área (Zaman *et al.*, 2018). Somente na região Nordeste brasileira, há uma área equivalente a 155 milhões de hectares afetados pela salinidade (Vieira *et al.*, 2016).

No Brasil a principal cultura energética, a cana-de-açúcar, não é comumente irrigada (Macedo *et al.*, 2005) e a disponibilidade de água dita a produtividade da colheita, sendo o principal fator limitante do seu rendimento (Dias; Sentelhas, 2019). Isso restringe seu cultivo às regiões em que os índices pluviométricos são favoráveis ao cultivo ao longo de todo o ano e sujeita o desempenho da indústria canavieira às condições climáticas.

Em 2021 a produção de cana foi amplamente atingida por seca e geadas, sendo que a moagem encerrou o ciclo com retração de 13,6% frente ao ano anterior após sucessivos anos de crescimento (UNICA, 2022).

O crescimento demográfico e econômico dos países em desenvolvimento aumentará consideravelmente a demanda por alimentos e fontes de energia alternativas. Esse fato atrelado a limitação de espaço para a agricultura e de recursos hídricos e a urgência em reduzir a dependência de combustíveis fósseis torna crucial a busca por soluções inovadoras que possam impulsionar a produtividade dos cultivos agroenergéticos sem aumentar o consumo de recursos naturais, especialmente diante do aumento dos desastres climáticos que ameaçam a estabilidade da produção agrícola (Lesk *et al.*, 2016).

Frente a este contexto desafiador, a pesquisa tem se concentrado cada vez mais na compreensão dos processos fisiológicos das plantas, buscando estabelecer culturas mais resilientes frente a condições adversas e mais eficientes em termos de bioenergia e, conseqüentemente, de viabilidade econômica.

O uso de ferramentas biotecnológicas emerge com a promessa de acelerar essa busca de aumento de produtividade e de tolerância de diversas culturas de interesse econômico frente a diferentes tipos de estresse (Datta, 2013) ou de obter plantas capazes de desenvolver-se em condições árduas, como, por exemplo, em solos salinos.

Isso porque o melhoramento tradicional é baseado na variação genética natural limitada (Rodriguez *et al.*, 2017) e depende de longos tempos de geração dos cruzamentos (Hickey *et al.*, 2019).

As estratégias baseadas em engenharia genética ampliam as possibilidades para o melhoramento genético, mantendo características já adquiridas nos indivíduos geneticamente transformados e inserindo de forma controlada novos traços desejados (Boehm; Bock, 2019).

Uma possível abordagem biotecnológica é a superexpressão de genes relacionados com a síntese de compostos osmoticamente ativos, como os polióis. O aumento de compostos que agem como osmólitos pode conferir à planta tolerância a estresses osmóticos, como a seca e a salinidade.

Os polióis participam dos ajustes para lidar com estresse em plantas e algas agindo como reguladores osmóticos (Li *et al.*, 2020). Desse modo, o melhoramento genético através da inserção de genes relacionados com a síntese de mio-inositol, um poliol que possui diversas funções fisiológicas nas plantas, pode possibilitar a expansão das áreas propícias ao cultivo de culturas energéticas sem aumentar a demanda por recursos hídricos, permitindo a criação de cultivares que demandam

menos água para o seu desenvolvimento e que toleram condições de estresse abiótico.

1.2. Mio-inositol

A Superexpressão de genes que participam da produção de moléculas que possuem papel ativo na aclimação ao estresse em plantas, como os polióis, é uma estratégia para conferir tolerância contra situações de cultivo adversas.

Os polióis, também denominados como açúcares álcoois, desempenham diversas funções biológicas essenciais em organismos vivos de diferentes classes. Esses compostos são caracterizados pela presença de vários grupos hidroxila (-OH) em sua estrutura molecular, conferindo-lhes propriedades bastante versáteis. Em plantas, são moléculas com papel importante na sinalização para aclimação a estresses bióticos e abióticos (Noiraud *et al.*, 2001), atuam como scavengers de espécies reativas de oxigênio (ROS), prevenindo o estresse oxidativo, agem como crioprotetores, modulam o transporte e absorção de sódio e o crescimento e desenvolvimento vegetal (Smirnoff; Cumbes, 1989; Hu *et al.*, 2020; Nelson *et al.*, 1999; Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2008a).

Os polióis também atuam na translocação e armazenamento de produtos fotossintéticos, agindo como reservatórios de energia e carbono. Em algumas espécies de plantas, polióis como o sorbitol e o manitol, são sintetizados e armazenados em tecidos especializados e podem ser mobilizados durante períodos de escassez de nutrientes ou condições de estresse, fornecendo energia para processos metabólicos vitais e garantindo a sobrevivência da planta. (Kanayama, 2009; Stoop, *et al.*, 1996).

Em situações de estresse osmótico, como seca ou salinidade, os polióis acumulam-se nas células, ajudando a manter o equilíbrio osmótico e prevenindo a desidratação celular, compensando o potencial hídrico reduzido. Por isso são solutos osmoticamente ativos. Esse papel de regulação osmótica é crucial para a sobrevivência desses organismos a condições adversas. 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).

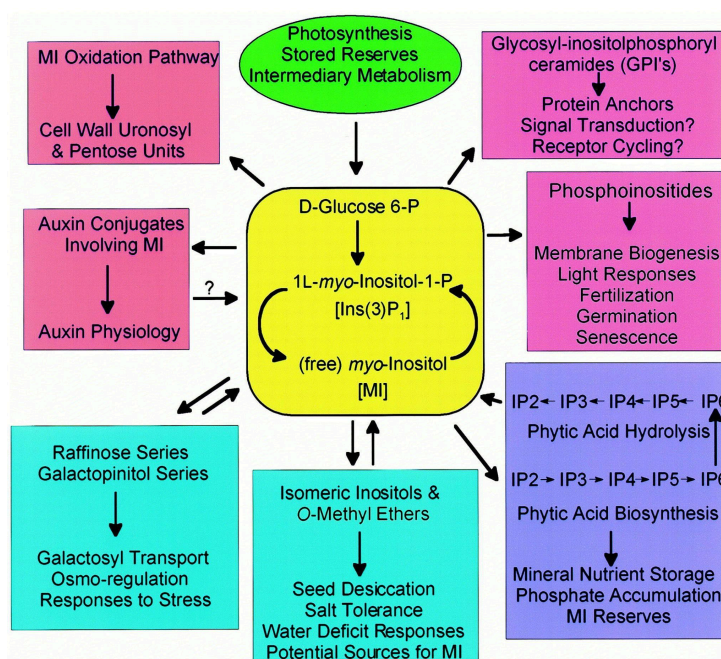
O mio-inositol (MI) é um polioli cíclico fundamental em uma variedade de processos biológicos. Presente em todas as formas de vida, desde bactérias até

mamíferos, desempenha funções diversas e essenciais em várias vias metabólicas e sinalização celular. Dezenas de metabólitos derivam-se do mio-inositol e exibem funções diversificadas em respostas ao estresse e sinalização celular (Valluru; Van Den Ende, 2011). Sua versatilidade é notável, sendo utilizado na formação de fosfolipídios, é precursor de fosfoinositídeos que atuam na modulação da expressão gênica e também tem papel relevante na proteção contra estresses ambientais. Além disso, o mio-inositol é um componente crítico de moléculas de sinalização, como o fosfatidilinositol, que desempenha um papel vital na transdução de sinais em células eucarióticas. Sua ampla distribuição e importância funcional destacam o mio-inositol como uma molécula chave na fisiologia e na regulação celular em organismos vivos (Valluru; Van Den Ende, 2011).

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

As principais funcionalidades do mio-inositol no metabolismo vegetal estão descritas na Figura 1.

Figura 1 – Funcionalidades do mio-inositol no metabolismo vegetal



Fonte: (Loewus; Murthy, 2000).

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 aclimação a estresse e produção de osmólitos.

Algas das espécies *Trebouxia sp.* e *Coccomyxa sp.* expostas a ciclos de dessecação e reidratação (D/R) acumularam diversos polióis, exemplificando o papel essencial desses compostos na tolerância à seca. Outros metabólitos associados a ajuste osmótico e ação antioxidante, como o ácido ascórbico e oligossacarídeos da família da rafinose também foram acumulados durante os ciclos de desidratação (Centeno *et al.*, 2016).

Em um segundo estudo com essas algas, identificou-se o aumento de expressão gênica de genes da via do MI e dos RFOs durante os ciclos de D/R, incluindo o gene da mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS), enzima limitante da biossíntese de MI, e os genes das proteínas inositol polifosfato fosfatase 1 e 2, MiPP1 e MiPP2 (Hell *et al.*, 2021),

Outros produtos da via do MI desempenham funções importantes na síntese de pectina da parede celular e na produção de compostos não celulósicos. Moléculas derivadas do MI, como os RFOs, pinitol e ononitol, têm uma ação osmoprotetora significativa (Loewus; Murthy, 2000). Além disso, o MI se une às auxinas, como o ácido indolacético (IAA), para transporte no floema. O IAA, um hormônio vegetal crucial para o crescimento, tem sua ação inibida pela conjugação com o inositol, o que permite seu transporte por longas distâncias dentro da planta (Cohen; Bandurski, 1982).

A tolerância à salinidade do ambiente está frequentemente associada a plantas que produzem polióis (Noiraud *et al.*, 2001). O MI é fundamental na sinalização entre folha e raiz, facilitando a absorção de sódio e auxiliando a planta a manejar os impactos do estresse salino (Nelson *et al.*, 1999). Em plântulas de *Mesembryanthemum crystallinum*, que são sensíveis ao sal, a adição de MI exógeno durante o estresse salino levou a padrões de expressão gênica e acúmulo de polióis semelhantes aos de plantas, que são tolerante à salinidade. Adicionalmente, a absorção e o transporte de sódio pelo xilema das plântulas foram aumentados na presença de MI, indicando a dependência da captação de sódio (Na) e 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). A aplicação exógena em

alho aumentou o crescimento vegetativo, rendimento dos bulbos, quantidade de minerais e bioconstituintes, melhorando seu valor nutricional (Yousef; Nasef, 2021).

O MI também mostrou atuar na seleção de microbioma, sendo capaz de alterar as interações entre plantas e bactérias, especialmente no estabelecimento de associações mutualísticas entre plantas e rizobactérias benéficas. O MI mostrou capacidade de atrair preferencialmente certas bactérias benéficas para as raízes das plantas, promovendo sua colonização e estabelecimento na rizosfera e promovendo crescimento aprimorado nas plantas. Além disso, pode servir como fonte alternativa de carbono para bactérias do solo, indicando seu potencial papel no suporte ao crescimento e metabolismo bacteriano na rizosfera (Vílchez, *et al.*, 2020).

Uma das enzimas da via do mio-inositol, a L-galactose 1-fosfato fosfatase, ou VTC4, atua tanto na produção de mio-inositol, quanto de ascorbato. Ambos compostos são cruciais para a regulação metabólica das plantas. Essa enzima foi selecionada devido à falta de estudos de superexpressão da VTC4 em plantas C4 e fortes indicativos de que a VTC4 está envolvida com a aclimação vegetal contra estresses abióticos, além de ter sua sequência completa nos bancos de dados e de proteínas pertencentes ao mesmo PFAM da VTC4 terem sido encontradas superexpressas em algas sob tratamento de D/R (Hell, *et al.*, 2021).

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

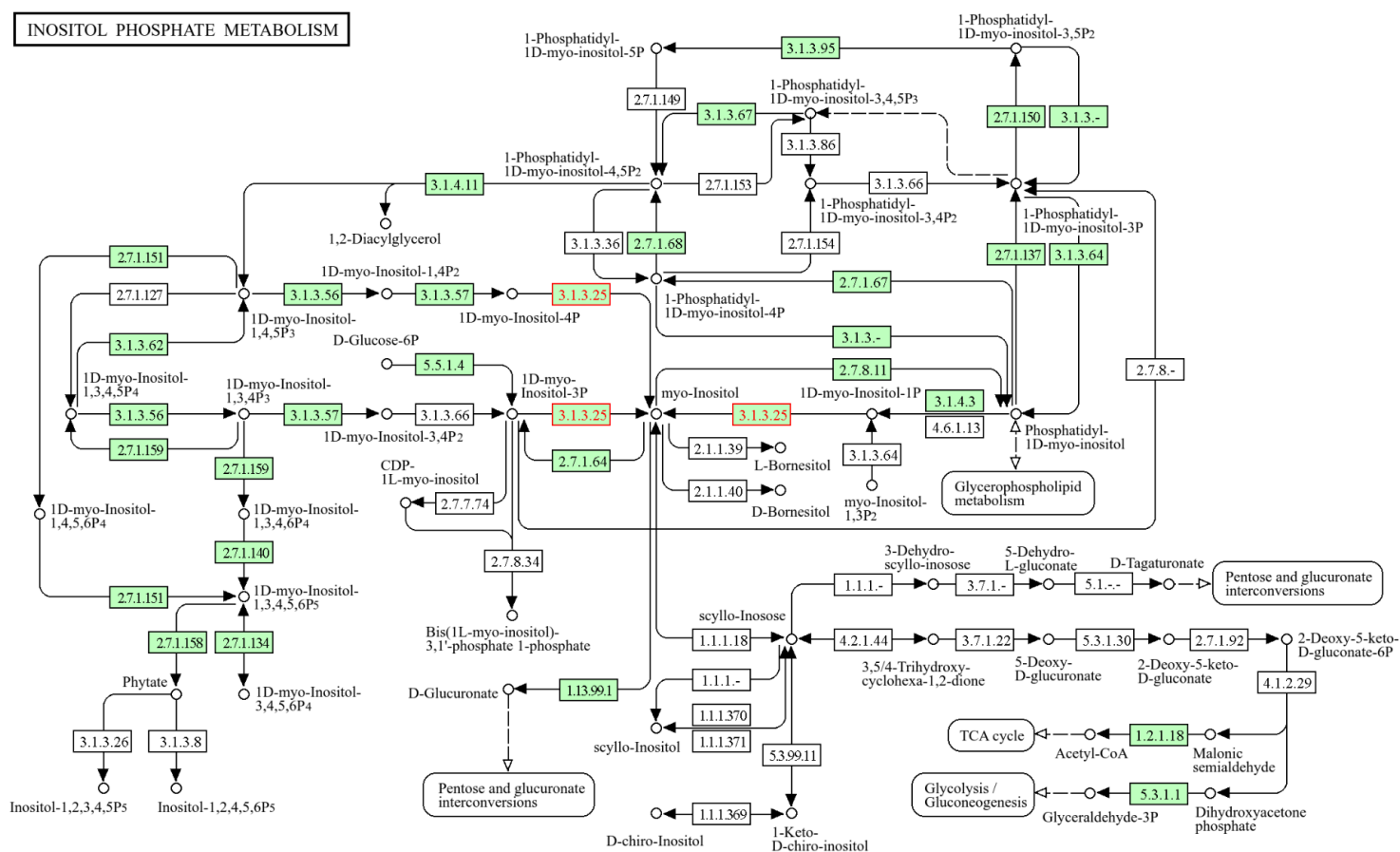
O gene VTC4 codifica a principal monofosfatase responsável por catalisar a etapa final da biossíntese *de novo* do mio-inositol. A proteína VTC4 é uma enzima bifuncional que atua nas vias de síntese de mio-inositol e do ascorbato (Torabinejad *et al.*, 2009), ambos metabólitos possuem funções antioxidantes. Essa enzima catalisa a síntese *de novo* de mio-inositol desfosforilando o mio-inositol-3-fosfato e o mio-inositol-1-fosfato e também atua na síntese de ascorbato, hidrolisando a L-Galactose-1-fosfato.

Nas pesquisas com algas realizadas pelo nosso grupo de estudo, foi possível identificar aumento de expressão de dois genes de mio-inositol monofosfatase (MiPP1 e MiPP2), o gene MiPP1 codifica uma enzima pertencente ao mesmo PFAM da VTC4 e tem funções bastante similares no metabolismo vegetal. A superexpressão dessas enzimas ocorreu durante os ciclos de dessecação e reidratação (Hell *et al.*, 2021), indicando que possuem um papel na aclimação ao estresse hídrico em algas.

A sequência gênica utilizada neste estudo é proveniente de *Coccomyxa subellipsoidea* e codifica a enzima *CsVTC4*.

A planta modelo *Setaria viridis*, possui o gene endógeno da VTC4. A via metabólica do mio-inositol e do ascorbato, e a ação da VTC4 nessas vias estão ilustradas na Figura 2 e 3.

Figura 2 – Via do metabolismo do inositol fosfato em *Setaria viridis*



Fonte: (Kegg, 2024).

Etapas catalisadas pela VTC4 estão destacadas em vermelho.

Analisando a via metabólica do inositol fosfato é possível notar que a enzima VTC4 tem um papel central na liberação de mio-inositol livre, que pode então ser utilizado para uma variedade de funções metabólicas e de sinalização.

cofator para muitos sistemas enzimáticos, sendo crucial na proteção contra estresse abiótico (Carr; Maggini, 2017; Mittler, 2002).

O *knockout* do gene da VTC4 em linhagens de *Arabidopsis* mutantes levou ao menor acúmulo de mio-inositol e de ascorbato nas plantas, as quais apresentaram alterações nas respostas contra o frio e estresse salino. As plantas com o gene silenciado apresentaram lentidão na germinação e crescimento radicular em condições de baixas temperaturas e menor germinação no meio salino, indicando um aumento geral na sensibilidade a estresses abióticos (Torabinejad *et al.*, 2009).

Esse gene também foi identificado como responsável por atuar na modulação do microbioma em *Arabidopsis*, cujos mutantes que possuem VTC4 disfuncional e tiveram a biossíntese de mio-inositol comprometida demonstraram menor promoção do crescimento das plantas induzida por *Bacillus megaterium* e redução na colonização por bactérias benéficas da rizosfera. A suplementação exógena de mio-inositol restaurou tanto a promoção do crescimento das plantas quanto a colonização bacteriana nesses mutantes (Vílchez *et al.*, 2020).

A VTC4 demonstrou ser uma enzima essencial na via metabólica do mio-inositol e do ascorbato, agindo na modulação desses compostos, e desempenha um papel importante na melhoria da germinação de sementes e no crescimento de mudas, particularmente em ambientes desafiadores.

A superexpressão do gene VTC4 em plantas apresenta um grande potencial para aumentar a tolerância ao estresse, principalmente por meio da amplificação da biossíntese de ascorbato e mio-inositol. Essas duas moléculas desempenham papel crucial na proteção das plantas contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, frequentemente induzido por condições ambientais desfavoráveis.

O ascorbato, também conhecido como vitamina C, é um antioxidante potente que elimina as espécies reativas de oxigênio (ROS) nocivas, protegendo as estruturas celulares de danos. Ele também participa de várias vias metabólicas essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Smirnoff, 1996). O mio-inositol, por outro lado, serve como precursor para uma variedade de compostos importantes, incluindo lipídios, fosfolipídios e osmólitos, todos envolvidos na sinalização celular e na osmorregulação (Loewus; Murthy, 2000).

Evidências adicionais que sustentam o papel do VTC4 na tolerância ao estresse vêm de estudos com o gene IMP de grão-de-bico superexpresso em *Arabidopsis*, que codifica uma enzima mio-inositol monofosfatase com alta similaridade funcional com a

VTC4. A superexpressão de IMP nessa espécie resultou em um acúmulo de mio-inositol e ascorbato. As plantas transformadas apresentaram melhor tolerância ao estresse durante a germinação de sementes e maior crescimento de plântulas em condições de estresse abiótico, incluindo salinidade, desidratação, calor, estresse oxidativo e frio (Saxena, *et al.*, 2013).

Considerando os resultados obtidos em diferentes estudos e espécies, a importância do gene selecionado em diversas vias de metabólitos relacionados com a proteção contra o estresse, como o mio-inositol, ascorbato, galactose e RFOs, espera-se que a superexpressão do gene VTC4 envolvido no metabolismo do MI possa conferir vantagens adaptativas frente às condições de estresses abióticos, como déficit hídrico e salinidade em espécies de plantas C4.

Isso pode ocorrer através de desvios metabólicos e acúmulo de compostos que auxiliam na proteção celular, além de fornecimento de mecanismos mais robustos para aumentar a resiliência das plantas frente às condições ambientais extremas, como modulação do microbioma, promovendo acúmulo de bactérias benéficas nas raízes das plantas.

1.4. O metabolismo C4

Com o aumento da demanda por biocombustíveis, as plantas de metabolismo C4 ganham mais atenção, devido a várias características que as tornam mais eficientes em relação à captura de carbono e à produção de biomassa.

O metabolismo vegetal C4 é um mecanismo fotossintético que envolve uma série de adaptações anatômicas e bioquímicas que permitem uma eficiente fixação de carbono reduzindo as perdas causadas pela fotorrespiração. A maior parte das espécies utilizadas para produção de etanol são C4, como, por exemplo, o milho, a cana-de-açúcar e o sorgo.

A fotorrespiração é um processo bioquímico que ocorre nas plantas durante a fotossíntese, especialmente em condições de altas temperaturas, estresse osmótico e baixas concentrações de CO₂, quando a planta enfrenta condições de estresse hídrico e fecha os estômatos, aumentando a concentração de oxigênio dentro das células (Foyer *et al.*, 2009).

A fotorrespiração ocorre quando a enzima RuBisCo (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase), envolvida na fixação do carbono durante a fotossíntese,

catalisa a ligação entre o oxigênio (O_2) e 1,5-ribulose-bisfosfato, invés de CO_2 e 1,5-ribulose-bisfosfato. Isso resulta na formação de um composto chamado 2-fosfoglicolato, que precisa ser metabolizado em um processo conhecido como ciclo de recuperação de fotorrespiração (Foyer *et al.*, 2009).

A fotorrespiração é considerada um processo que desperdiça energia e carbono, pois consome ATP e libera CO_2 sem produzir compostos orgânicos utilizáveis. Nas plantas C3, onde a Rubisco está presente nas células do mesófilo, a fotorrespiração pode ser um problema significativo, especialmente em condições de estresse ambiental. No entanto, nas plantas C4, onde há separação espacial da fixação de carbono, esse processo é minimizado, conferindo uma vantagem adaptativa em ambientes quentes e secos.

Nas plantas C4, o processo de assimilação de CO_2 é dividido entre duas células especializadas: as células do mesófilo e as células da bainha do feixe vascular.

Nas células do mesófilo, o CO_2 reage com o fosfoenolpiruvato (PEP) pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, que reage especificamente com o CO_2 e não tem afinidade com o oxigênio, formando oxaloacetato, que é convertido para malato. O malato é transportado para as células da bainha do feixe vascular, onde é quebrado e há liberação de CO_2 . Nas células da bainha do feixe está localizada a enzima RuBisCo, que então fará a fixação de carbono (Weber; von Caemmerer, 2010).

Essa separação espacial da fixação de carbono permite que a RuBisCo opere em um ambiente de alta concentração de CO_2 , reduzindo a ocorrência de fotorrespiração. Além disso, as plantas C4 possuem altas taxas de transporte de carbono, facilitando a reciclagem de intermediários do ciclo de Calvin-Benson, aumentando assim a eficiência global da fotossíntese (Weber; von Caemmerer, 2010).

As plantas C4 também demonstram uma capacidade superior de controlar a absorção de nitrato (NO_3^-) em comparação com as plantas C3 e apresentam uma separação espacial mais eficiente das enzimas de assimilação de nitrogênio, o que contribui para sua maior eficiência no uso deste nutriente. Adicionalmente, exibem níveis mais baixos de enzimas como RuBisCo e expressão gênica relacionada à síntese de proteínas, o que contribui para sua maior eficiência no uso de nitrogênio em comparação com as plantas C3 (Zhang; He, 2020). Essas adaptações conferem às plantas C4 uma vantagem em ambientes desafiadores, contribuindo para sua presença em todo o globo e altas taxas de produtividade.

As culturas bioenergéticas mais importantes tem como metabolismo fotossintético o metabolismo C4, já que são mais eficientes na fixação do carbono atmosférico. Grande parte dessas culturas pertencem à família Poaceae e incluem: *Zea mays* (milho), *Sorghum bicolor* (sorgo) , *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar), *Panicum miliaceum*, *Pennisetum glaucum*, *Setaria*, *Miscanthus x giganteus*, e *Panicum virgatum*.

As espécies C4, como *Zea mays*, *Sorghum bicolor* e *Saccharum officinarum*, são particularmente estudadas devido ao seu potencial comercial na produção de biomassa para bioenergia, mas espécies modelos de plantas C4 surgem como uma alternativa de manipulação mais fácil para realização de estudos, como a *Setaria viridis*.

1.5. *Setaria viridis*

Recentemente, a espécie de monocotiledônea do gênero *Setaria viridis* tem sido considerada uma excelente planta modelo para pesquisas relacionadas à produção de bioenergia. Oferece oportunidades promissoras para investigar métodos para melhorar a qualidade nutricional, mecanismos de resposta a estresses bióticos e abióticos, métodos para aumentar a eficiência fotossintética e potencializar a produção de biomassa em gramíneas do tipo C4.

O uso de *Setaria viridis* como planta modelo C4 traz várias vantagens significativas para pesquisas científicas, pois possui um ciclo de vida curto, requisitos simples de crescimento, protocolos de transformação genética eficientes e bem estabelecidos, genoma pequeno e sequenciado, o que simplifica análises genéticas e funcionais, facilidade de cultivo, autofecundação e grande geração de sementes, facilitando estudos de biologia vegetal em laboratório (Martins *et al.*, 2015).

Estudos com eventos transgênicos em *Setaria viridis* têm reforçado sua utilidade como modelo para avaliar características agronômicas em gramíneas com metabolismo C4. Esses estudos funcionais fornecem uma prova-de-conceito valiosa, permitindo a transferência de conhecimentos para espécies de interesse econômico. A notoriedade crescente de *Setaria viridis* como planta modelo é atribuída à sua relação filogenética próxima com culturas importantes como milho, sorgo e cana-de-açúcar, destacando seu potencial em pesquisas básicas e aplicadas em Poaceae (Bennetzen *et al.*, 2012; Brutnell *et al.*, 2010; Doust *et al.*, 2009). O gênero

Setaria conta com mais de 100 espécies. *Setaria viridis* é considerada uma espécie ancestral (Kellogg, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, grande parte do etanol é feito a partir de cana-de-açúcar e 64,6% da produção é concentrada na região Sudeste (CONAB, 2024a). Projeções indicam que o Sudeste brasileiro pode enfrentar mais eventos de seca devido às mudanças climáticas, afetando a agricultura e a produção energética (Geirinhas *et al.*, 2021). Como a cana não é irrigada no Brasil (Dias; Sentelhas, 2019), as secas afetam severamente seu rendimento e o conteúdo de sacarose (Reyes *et al.*, 2021).

A susceptibilidade da indústria sucroenergética às condições climáticas fica clara quando se debruça sobre a produção das últimas duas safras. Em 2023/2024, chuvas abundantes e temperaturas moderadas no Centro-Sul resultaram em um rendimento recorde de 85.580 kg/ha e um crescimento de 16,8% na produção, com 0,5% de acréscimo da área colhida (CONAB, 2024b). A safra 2024/2025 enfrentou estiagem e altas temperaturas, tendo uma queda de 7,6% na produtividade e 3,8% na produção, mesmo com aumento de 4,1% na área colhida (CONAB, 2024a).

Assim, o desenvolvimento de genótipos resilientes às mudanças climáticas é uma abordagem essencial para a viabilidade econômica das culturas (Zafar *et al.*, 2020). A manipulação de genes para a síntese de moléculas protetoras, como os poliois, é uma possível abordagem para a obtenção de linhagens tolerantes ao estresse osmótico (Kanayama, 2009).

O mio-inositol (MI) e seus metabólitos têm papel central no crescimento, aclimação e desenvolvimento das plantas (Smirnoff; Cumbes, 1989; Hu *et al.*, 2020; Nelson *et al.*, 1999). Já há extensa literatura de superexpressão de genes como MIPS, IMP e MIOX em plantas C3, com obtenção de resultados promissores (Hu *et al.*, 2022; Nisa *et al.*, 2016; Lisko *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2019).

Diante dos resultados e do contexto exposto faz-se necessário o estudo de eventos transgênicos da planta modelo C4, *Setaria viridis*, superexpressando o gene VTC4 da via do mio-inositol, visando identificar quais alterações metabólicas são ocasionadas e como estas impactam nos mecanismos de tolerância da planta. O sucesso na obtenção de eventos transgênicos de *Setaria viridis* mais tolerantes ao estresse osmótico permite posterior aplicação em plantas de interesse energético. Isso pode resultar em maior produtividade, menor uso de água e possível expansão das áreas adequadas ao cultivo de plantas C4, sem que seja necessário desmatar para expandir a área cultivada.

3. OBJETIVOS

A presente dissertação tem como principal objetivo avaliar a linhagem transgênica de *Setaria viridis* superexpressando o gene *CsVTC4*, quanto a tolerância a estresses abióticos e seus objetivos específicos são:

- Identificar a sequência do gene alvo em *Coccotheca 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.
- Caracterizar as trocas gasosas das plantas transformadas em comparação às plantas selvagens.

4. METODOLOGIA

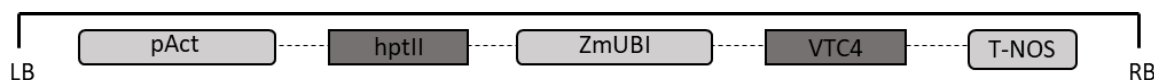
4.1. Análises *in silico* e construção do vetor

Com base nos estudos anteriores do grupo de estudo e nos dados da literatura foi selecionado e investigado o gene VTC4, pertencente a família mio-inositol monofosfatase (IMP), cujos genes homólogos de algas estavam envolvidos na síntese de polióis durante a perda severa de água (Hell *et al.*, 2021).

Sua sequência genética foi identificada no Phytozome, foi feito um BLASTn com a sequência do transcrito do gene, para verificar a identidade com o transcrito do gene VTC4 endógeno de *Setaria viridis*.

A sequência selecionada para transformação teve seus códons verificados e ajustados para monocotiledôneas (Apêndice A). 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) sob controle de um promotor constitutivo de actina (pAct) e um terminador da nopalina sintetase (T-NOS) (Figura 4).

Figura 4 - 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 *Coccomyxa subellipsoidea*, e (T-NOS) Terminador da nopalina sintetase.

O vetor foi inserido em *Escherichia coli* cepa MACH1T1 utilizando protocolo de transformação de 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 , que foi utilizada para a transformação genética de *S. viridis*.

4.2. Transformação Genética e análises moleculares

Sementes de *Setaria viridis* selvagem linhagem A10.1 foram usadas para indução de calos embriogênicos. As sementes tiveram as lemas e as 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 PhytigelTM]. 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 105α) previamente transformada com o plasmídeo de interesse foi preparada inoculando uma colônia em 5 mL de meio 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 OD₆₀₀ = 0,6. A suspensão bacteriana foi centrifugada e o pellet foi ressuspenso em meio CIM líquido.

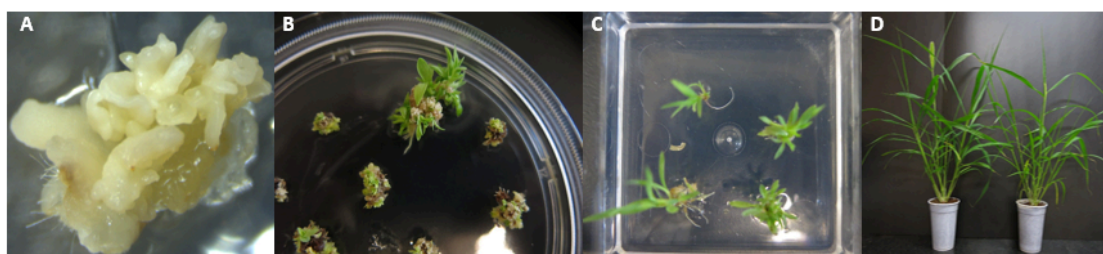
Os calos embriogênicos foram incubados por 5 min em suspensão de *A. tumefaciens* contendo 200 mM de acetoseringona e 10 µL de Solução Synperonic 10% PE/F68 (Sigma–Aldrich) a cada 1 mL de suspensão.

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 mmol m⁻²s⁻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 μmol m⁻²s⁻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 5. Ao final do ciclo, as sementes foram coletadas e utilizadas para obtenção de linhagens homozigotas.

Figura 5 - 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.

As plantas regeneradas com 30 dias de idade que se mostraram resistentes à higromicina tiveram as folhas rapidamente congeladas após a coleta e pulverizadas com nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído e isolado do pó das plantas potencialmente transformadas e não transformadas (NT) seguindo o método de extração por brometo de cetiltrimetilamonio (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:CTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGT 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 conforme as instruções do fabricante.

As análises de expressão por 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). Para cada evento transformado e para a linhagem selvagem foram utilizadas três replicatas biológicas (N = 3).

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

Os transgenes possuem característica de alelo dominante e são herdados no cruzamento na proporção Mendeliana de 3:1 quando presentes em cópia única no genoma da planta transformada (Christou *et al.*, 1989). Assim, as plantas T1 resistentes a higromicina que foram geradas a partir das sementes da geração T0 das plantas que apresentaram esse padrão de segregação (confirmado através do teste do qui-quadrado) foram selecionadas para seguir com a segregação.

As sementes dessas plantas T1 foram germinadas e as que apresentaram padrão mendeliano de 1:0 (100% de resistência a higromicina) foram selecionadas como plantas homozigotas para a presença do transgene. Essas plântulas de geração T2 foram cultivadas e tiveram suas sementes coletadas para

prosseguimento do estudo, a fim de garantir estabilidade do transgene nas próximas gerações.

4.3. Aplicação de estresse em plântulas

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, com 3 replicatas biológicas de cada evento em cada tratamento (N = 3). A germinação das plantas foi analisada após 8 a 10 dias.

4.4. Aplicação de estresse em solo em plantas

As sementes dos eventos transgênicos e de uma linhagem selvagem foram germinadas em meio de desenvolvimento para *Setaria viridis*. Após uma semana as plântulas foram transferidas para copos plásticos de 300ml contendo solo: vermiculita (2:1). As plantas foram cultivadas sob condições controladas em sala de cultivo (26 °C, 16h luz/ 8h escuro de fotoperíodo, 50% umidade relativa do ar). Diariamente as plantas foram regadas com água destilada e fertilizadas com uma solução nutritiva de Hoagland Arnon (1950) a cada 15 dias.

Para avaliar o desempenho sob estresse abiótico das linhagens transgênicas homozigotas de *Setaria viridis* que superexpressam o gene VCT4 (de *Coccotheca subellipsoidea*), plantas na fase de *booting* foram submetidas ao estresse hídrico e salino.

Para a imposição do estresse hídrico, a irrigação foi suspensa até que os vasos atingissem ~5% de conteúdo de água no solo. A umidade foi medida

diariamente com auxílio de um medidor de umidade de solo ML3 Theta Probe (Delta-T Devices). A baixa umidade foi mantida por 72 horas e após esse período as plantas foram irrigadas.

As plantas sob estresse salino foram irrigadas usando uma solução de NaCl a 250 mM a cada 3 dias durante 15 dias.

4.5. Análises Biométricas

4.5.1. 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 utilizada a fórmula abaixo.

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

Para cada concentração de sal foram analisadas 3 placas de cada evento com 50 sementes em cada placa (N=3).

4.5.2. Crescimento Radicular

Plântulas germinadas em meio MS em placa de petri sob condições de estresse salino (8 a 10 dias) e condição de controle tiveram suas raízes mensuradas. Foi utilizada a raiz principal como parâmetro de medida, esse procedimento foi realizado com o auxílio de um paquímetro ou régua e os valores obtidos foram tabulados. Foram utilizadas 10 replicatas biológicas para cada condição e evento (N = 10).

4.5.3. Biomassa das plântulas

Depois do período de germinação de 8 a 10 dias as plântulas foram retiradas do meio de cultura, secas em papel toalha para remover resquícios do meio de cultura e por fim foram pesadas em balança analítica. Dez plântulas de cada evento em cada condição foram pesadas (N = 10).

4.5.4. Biomassa das plantas

Após a aplicação do estresse salino e hídrico as plantas foram retiradas do solo e a parte aérea foi cortada e seca em estufa a 60 °C durante uma semana. Posteriormente, o material biológico foi pesado em balança analítica. Foi utilizada triplicata biológica de cada evento para cada tratamento (N = 3).

4.6. Quantificação de polióis totais

A quantificação de polióis totais das amostras foi realizada de acordo com Bok *et al* (1977), utilizando método colorimétrico como descrito abaixo.

Inicialmente o tecido de plântulas com 8 a 10 dias e plantas com 45 a 55 dias de idade foi coletado e liofilizado. 0,015g de tecido de cada amostra foi pesado e extraído três vezes com 300 ml de etanol por 15 minutos a 80 °C. O extrato etanólico foi diluído em água na proporção de 1:20. Foi utilizada triplicata biológica para cada amostra (N = 3).

O reagente Nash foi preparado misturando 150 g de acetato de amônio, 2 ml de ácido acético glacial e 2 ml de pentano-2,4-diona, e em seguida, diluindo a mistura para 1 litro com água destilada.

200 µl do extrato etanólico diluído foram colocados em microtubos de 2 ml, adicionou-se 200 µl de metaperiodato de sódio 0,015 M em HCl 0,12 M aos tubos de ensaio. Após misturar e permitir repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 400 µl de uma solução de L-ramnose a 0,1% a cada tubo para remover o excesso de íon periodato.

Após nova mistura, adicionou-se 800 µl do reagente Nash. A coloração foi desenvolvida por 15 minutos em banho-maria a 53 °C. Após resfriamento, a absorbância foi medida a 412 nm em um espectrofotômetro.

Curvas padrão de calibração para polióis foram feitas na faixa de 0-25 µg/ml utilizando sorbitol, eritrol, manitol, galactitol e mio-inositol e as absorbâncias obtidas para as amostras foram comparadas com as curvas padrão para determinar a concentração de polióis totais nas amostras.

4.7. Metabolômica

Os tecidos frescos das plântulas e plantas foram coletados e preparados para análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

(GC/MS) conforme descrito. Seis replicatas de cada evento em cada tratamento foram utilizadas para seguir com a extração (N = 6).

As plântulas foram coletadas com 8 a 10 dias após germinação e as plantas foram coletadas após a aplicação de estresse, na fase de *pré-booting*, com cerca de 45 a 55 dias após a germinação.

O tecido vegetal foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, então o material foi liofilizado a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aproximadamente 60 mg de material biológico liofilizado foram pesados e macerados em um macerador de amostras com auxílio de *beads* de metal e posteriormente 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 ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, sob agitação) e centrifugada (13000 rpm, 5 min). A fase polar foi transferida e a 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 em seguida foi realizado o processo de silição (Centeno *et al.*, 2016).

Ao material seco foram adicionados 150 μl de piridina e 50 μl de BSTFA, a mistura foi submetida à agitação e aquecida a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, a interface a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a fonte de íons foi ajustada para $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de aumento da temperatura a $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $310\text{ }^{\circ}\text{C}$, e um minuto final de aquecimento a $310\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O sistema foi então equilibrado por 6 min a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 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) e com tecido de plantas cultivadas em situação controle e após aplicação de estresse.

4.8. Análises de trocas gasosas

Medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração de CO_2 intracelular (C_i , μL^{-1}) foram feitas em plantas de *S. viridis*, utilizando 5 replicatas para cada evento ($N = 5$). Para essas medidas foram utilizadas folhas classificadas como primárias, que são as primeiras folhas expandidas de cada planta, considerada adulta. Um sistema analisador portátil de troca gasosa por infravermelho (IRGA) modelo LI-6800 (LI-COR) foi utilizado sob condição ambiente de CO_2 (média de 400 ppm de CO_2 no período de experimento). A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) foi de $1500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.9. Análise Estatística

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

Para os dados de metaboloma foi realizada a análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) utilizando o metaboanalyst.

5. RESULTADOS

5.1. Análises *in silico*

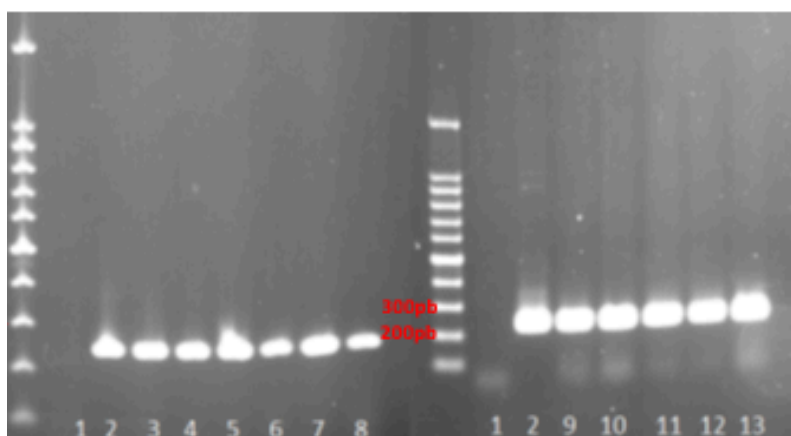
Uma vez determinada a sequência alvo, um vetor binário de transformação foi obtido por meio da empresa DNA Cloning Service. O vetor do gene L-galactose 1-phosphate phosphatase (CsVTC4) possui ~14kb. A sequência do transcrito do gene VTC4 estava completa no banco de dados do phytozome, característica necessária para realização dos estudos funcionais. O transcrito do gene CsVTC4 de *Coccomyxa subellipsoidea* C-169, possui 69,79% de identidade com o transcrito do mesmo gene de *Setaria viridis* e foi então selecionado para prosseguimento do estudo.

5.2. Transformação genética

A partir do protocolo de transformação descrito no item 4.2 foram obtidos 11 eventos transgênicos oriundos de calos embriogênicos independentes. Após a extração do DNA, foi realizada a confirmação da integração do vetor no genoma das plantas regeneradas em meio seletivo, com a técnica de PCR.

Foi testada a integração do vetor utilizando um *primer* para o gene de tolerância a higromicina, 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 com o gene CsVTC4.



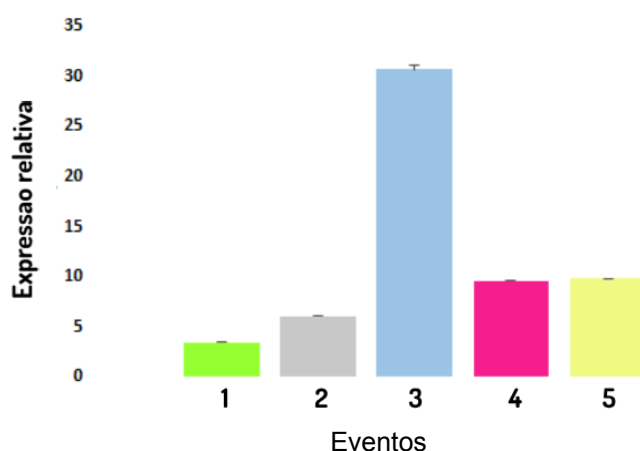
1- Planta selvagem, 2- plasmídeo, 3-13 eventos T0 de transformação o gene L-galactose 1-phosphate phosphatase (CsVTC4) em *Setaria viridis*

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 se avaliou 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 expressos em relação aos genes de referência.

O evento 3 apresentou o maior nível de superexpressão, os eventos 4 e 5 uma superexpressão intermediária próxima de 10 vezes mais expressos em relação aos genes de referência e os eventos 1 e 2 uma superexpressão menor próxima a 5 vezes mais expresso, 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*



5.3. Aplicação de estresse em plântulas

Os eventos previamente selecionados por meio das análises moleculares foram submetidos a estresse salino em placas de petri. Os experimentos foram conduzidos em 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 com o gene da *CsVTC4* demonstraram maior tolerância às condições de estresse comparado às plantas selvagens, como descrito no item 5.5.

5.4. Análises biométricas

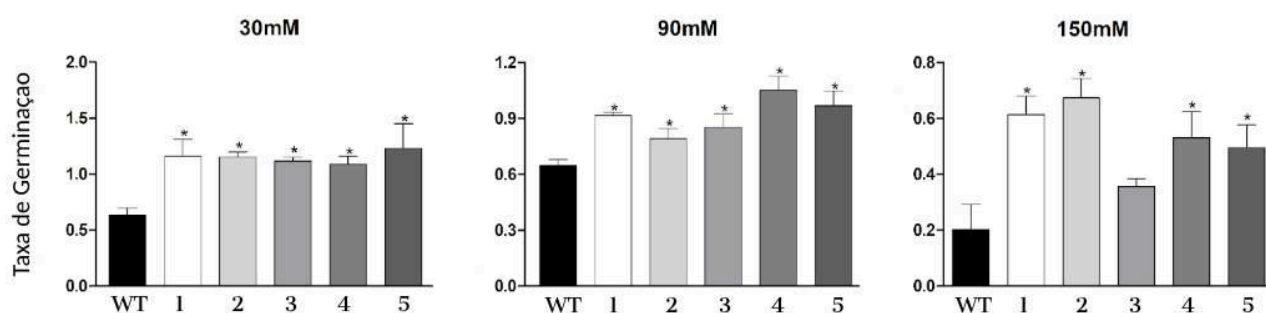
5.4.1. Taxa de Germinação

Após 10 dias em meio de cultura suplementado com NaCl foi observado a taxa de germinação dos eventos transgênicos e selvagem e o cálculo da taxa de germinação foi realizado como descrito no item 4.7.1.

Foi possível observar um melhor desempenho das plantas transformadas em relação à selvagem.

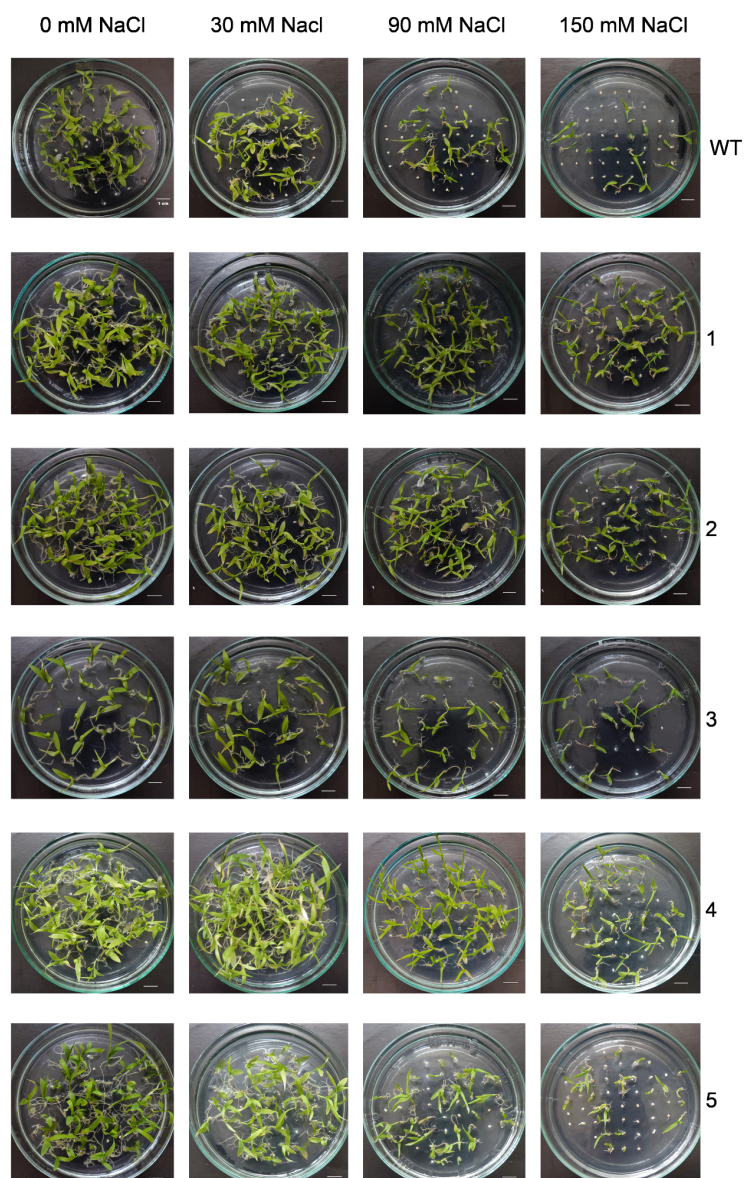
As plantas transformadas com o gene da *CsVTC4* apresentaram taxa de germinação que foi entre 9 a 55% maior que a taxa de germinação das plantas selvagens nas diferentes concentrações de NaCl (Figuras 8 e 9). As taxas superiores de germinação dos eventos transgênicos é um indício de que essas plantas apresentam maior tolerância ao sal, independentemente da severidade do estresse salino.

Figura 8 – Taxa de germinação das plântulas de *Setaria viridis* em diferentes concentrações de NaCl.



O resultado é apresentado como média \pm SE de 3 replicatas independentes. Diferenças significativas entre o tipo selvagem e as linhas transgênicas, estimadas pelo teste-t são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

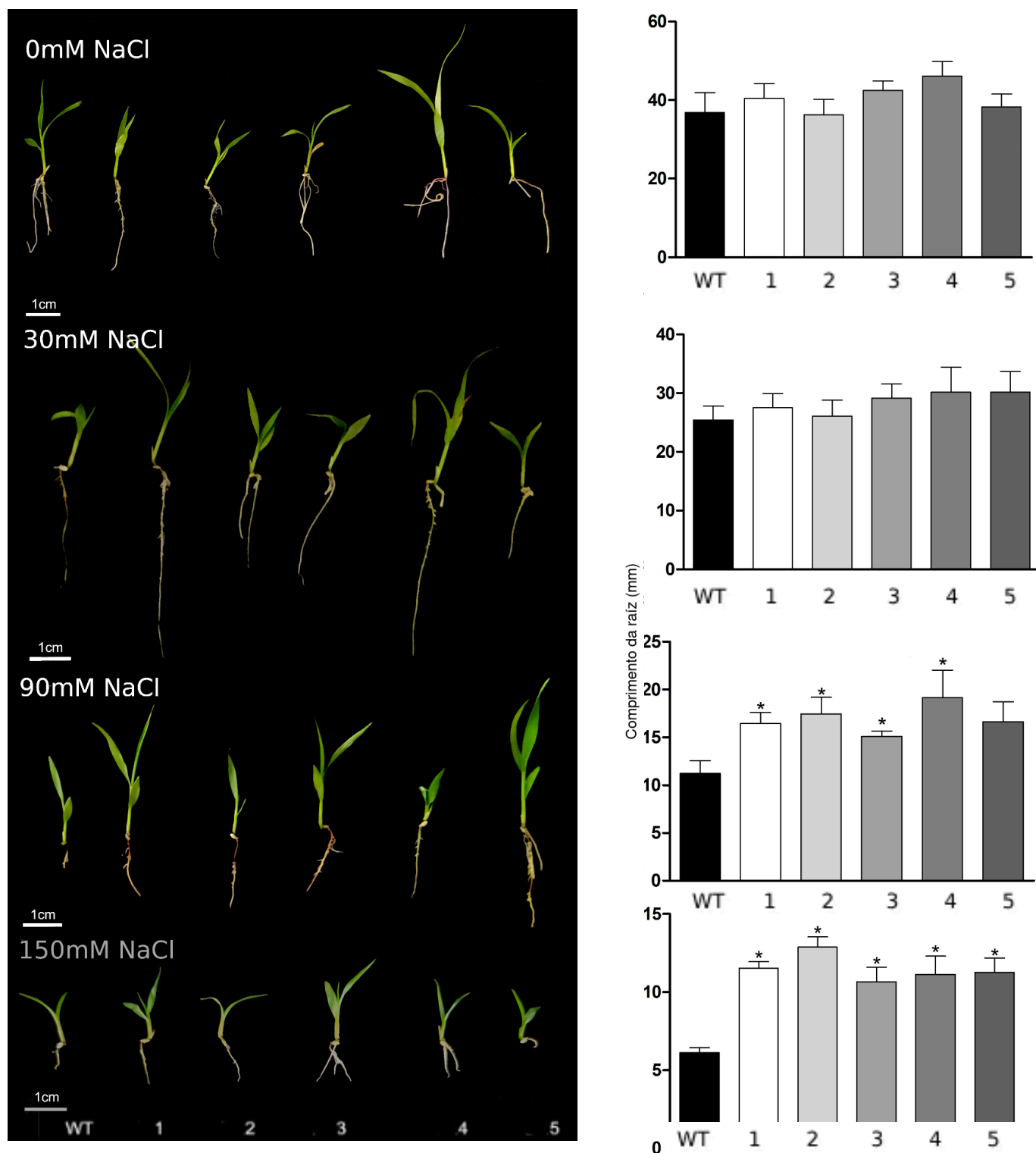
Figura 9 - Germinação de sementes de *Setaria viridis* em meio de cultura suplementado com NaCl



5.4.2. Crescimento Radicular e da Parte Aérea de Plântulas

As plantas transformadas tiveram maior crescimento radicular em diferentes concentrações de cloreto de sódio (0, 30, 90 e 150 mM) (Figura 10), com diferença estatística 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* germinadas em meio suplementado com NaCl

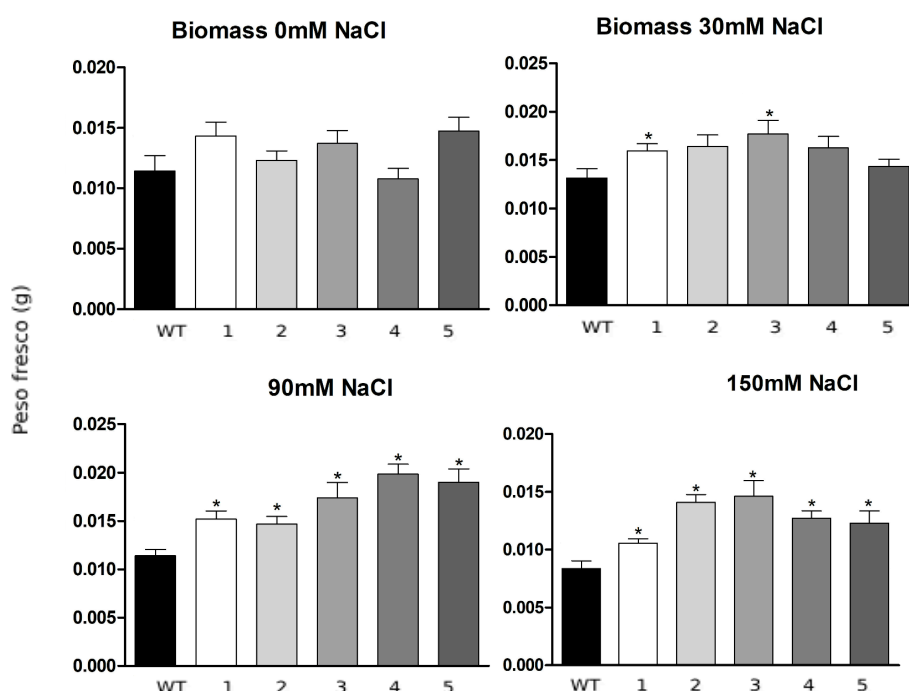


O resultado é apresentado como média \pm SE de dez replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas entre o tipo selvagem e as linhas transgênicas, estimadas pelo teste-t são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

5.4.3. Biomassa 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 11).

Figura 11 - Peso fresco das plântulas de *Setaria viridis* germinadas em diferentes concentrações de NaCl

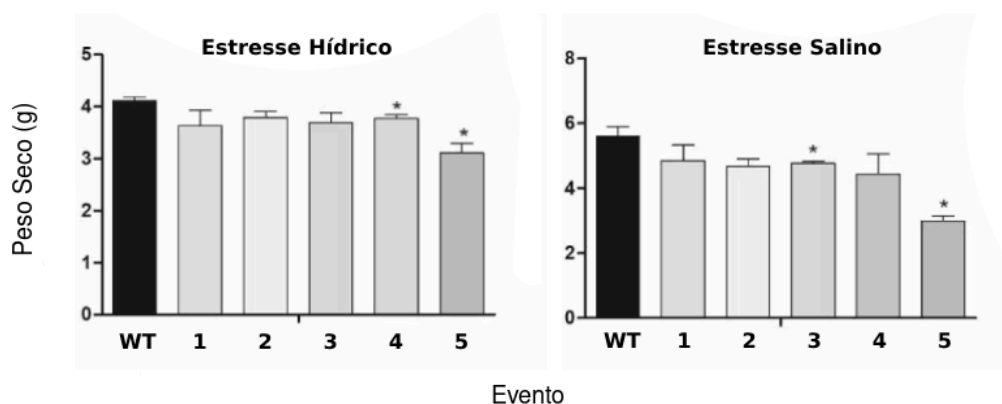


O resultado é apresentado como média \pm SE de dez replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas entre o tipo selvagem e as linhas transgênicas, estimadas pelo teste-t são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

5.4.4. Biomassa das plantas

O peso seco das plantas superexpressando o gene *CsVTC4* foi medido para as condições experimentais de estresse e o evento 5 apresentou uma diminuição na biomassa em todas as condições. O evento 4 apresentou redução de biomassa na condição de estresse hídrico e o evento 3 na condição de estresse salino, outros eventos não apresentaram diferença no acúmulo de biomassa em nenhuma das condições (Figura 12).

Figura 12 - Peso seco da parte aérea de plantas de *Setaria viridis* cultivadas sob condições de estresse osmótico



As plantas foram submetidas a estresse salino ou hídrico. O peso seco da parte aérea é apresentado como média \pm SE de três replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas entre o tipo selvagem e as linhas transgênicas, estimadas pelo teste de Tukey (HSD), são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

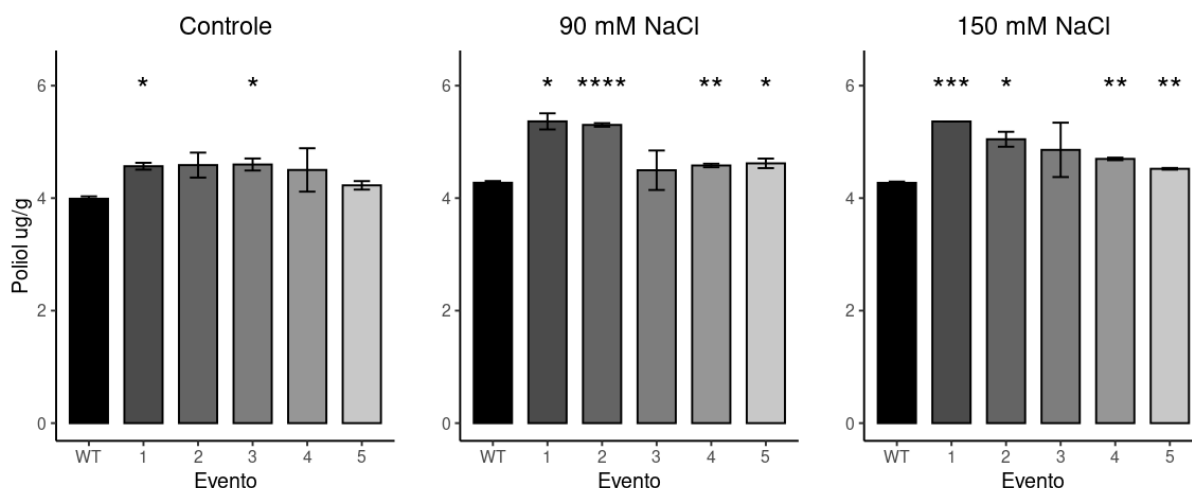
5.5. Quantificação de polióis totais

5.5.1. Plântulas

As plântulas superexpressando o gene *CsVTC4* foram capazes de acumular polióis nas condições de controle e de estresse salino em placas de petri. Sendo que todos os eventos transformados, exceto o evento 3 apresentaram diferença significativa em relação à linhagem selvagem em meio suplementado com 90 mM e 150 mM de NaCl (Figura 13).

É possível notar um aumento da quantidade de polióis totais nas plantas transgênicas do evento 1 e 2 e 5 em condições de estresse. O mesmo não ocorre na linhagem selvagem, que mantém o nível de polióis estável em todos os tratamentos.

Figura 13 - Polióis totais em plântulas de *Setaria viridis* germinadas em diferentes concentrações de sal

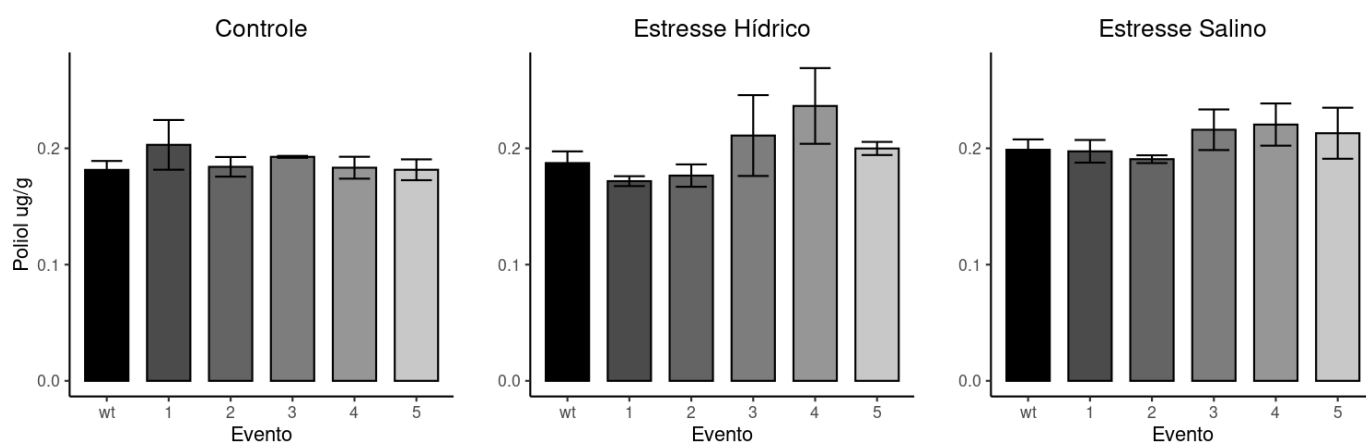


O resultado é apresentado como média \pm SE de três replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas entre o tipo selvagem e as linhas transgênicas, estimadas pelo teste-t, são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$ *, $P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****).

5.5.2. Plantas

Em contraste com os resultados obtidos em plântulas, não foi possível observar acúmulo de polióis em plantas superexpressando o gene *CsVTC4* em nenhuma das condições experimentais (Figura 14).

Figura 14 - Polióis totais em plantas de *Setaria viridis* cultivadas em condição de controle e estresse osmótico



O resultado é apresentado como média \pm SE de três replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas entre o tipo selvagem e as linhas transgênicas, estimadas pelo teste-t, são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

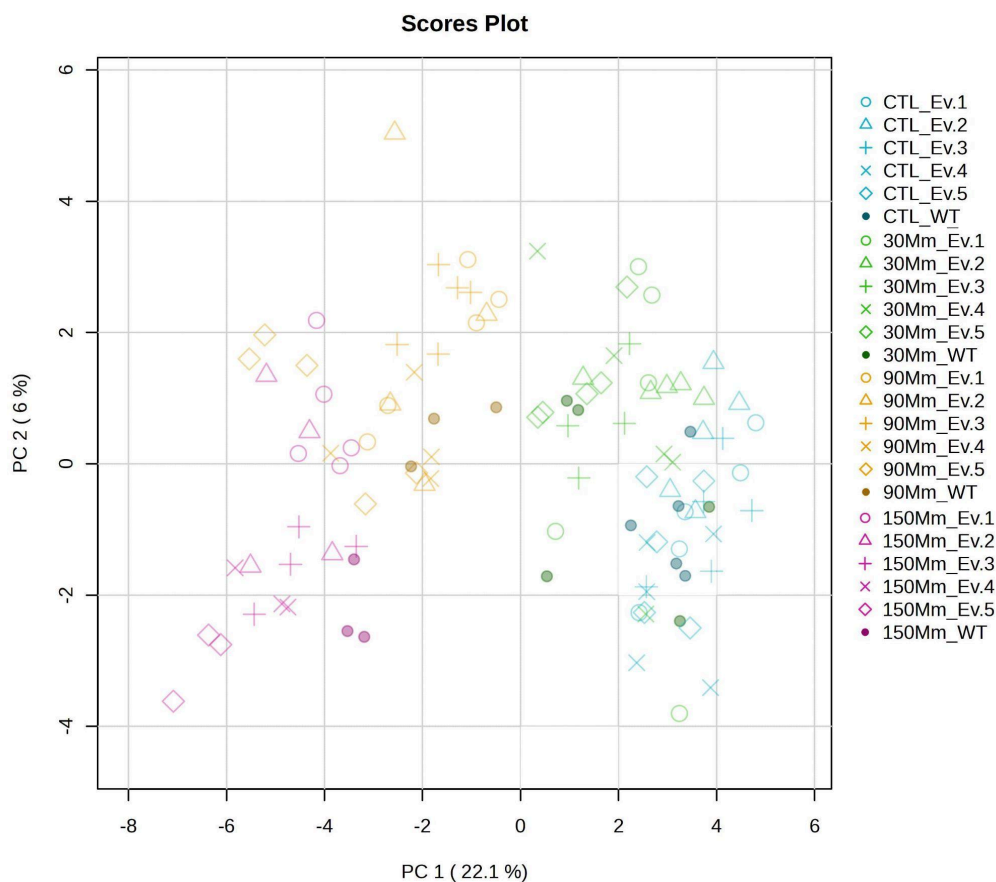
5.6. Metabolômica

5.6.1. Plântulas

O perfil metabólico das plântulas submetidas ao estresse salino de 90 e 150 mM se distingue de maneira acentuada da condição controle, o mesmo não é observado para o perfil das plântulas 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 as condições de 0 e 30 mM não há grandes mudanças no perfil metabólico, enquanto na comparação entre os tratamentos de 90, 150 mM, há uma modulação bem maior do metaboloma (Figura 15).

Figura 15 - PCA do perfil metabólico das plântulas de *Setaria viridis* germinadas em diferentes concentrações de NaCl

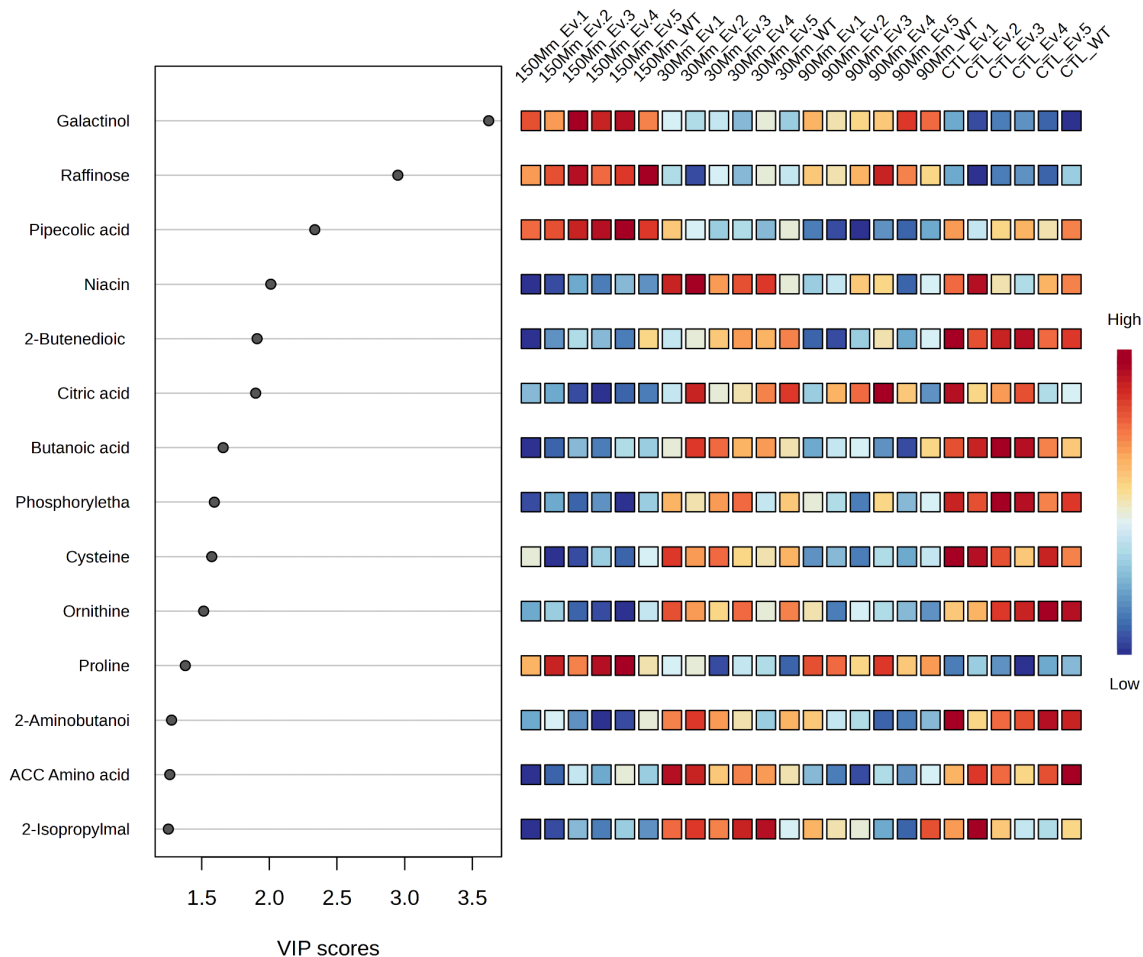


CTL - Condição controle, 30mM - Germinação em meio suplementado com 30mM de NaCl, 90mM - Germinação em meio suplementado com 90mM de NaCl, 150mM - Germinação em meio suplementado com 150mM de NaCl.

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.

Através da análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram identificados os 14 metabólitos com maior importância para a diferenciação dos grupos (figura 16).

Figura 16 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de *Setaria viridis* germinadas em diferentes concentrações de NaCl



Foi possível notar que o galactinol e a rafinose foram os principais compostos que diferenciam os grupos de estresse mais severo (90 e 150 mM) dos grupos controle e do tratamento de 30 mM de NaCl. Além desses dois compostos, é possível observar alta correlação com a prolina para diferenciar os grupos de estresse severo, em todos os eventos.

Além disso, o ácido pipecólico teve alta correlação com o tratamento de 150 mM de NaCl e uma correlação média com o controle.

Diversos ácidos e aminoácidos foram importantes para a diferenciação dos grupos controle e 30 mM, como, por exemplo, niacina, ácido 2-butenodióico, ácido butanóico, cisteína, ornitina, entre outros compostos.

Ao se analisar o *Heatmap* dos metabólitos identificados nas plântulas germinadas na condição controle (figura 28) observa-se nas plântulas transgênicas um maior acúmulo de alanina, ácido glicérico, tirosina, ácido butanoico, ácido ferúlico, pinitol (principalmente no evento 3), serotonina, sorbitol, e ácido oxálico e menor acúmulo de rafinose, ácido chiquímico, aminoácido ACC e monoetilfosfato. Em maiores concentrações de sal, o perfil metabólico foi diferente.

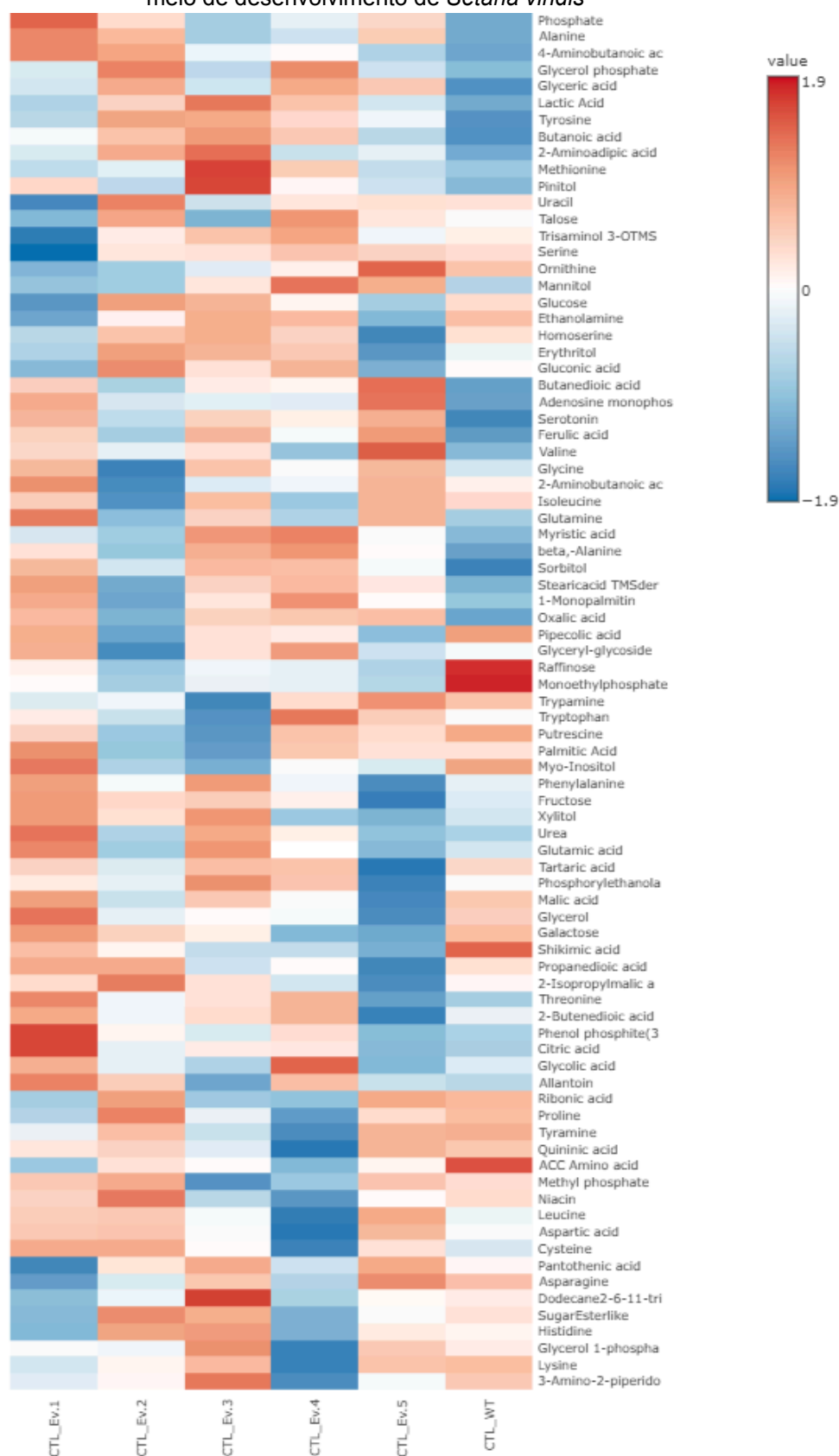
Convém destacar o acúmulo do ácido glucônico (Ev. 2, 3 e 4) e do ácido glutâmico (Ev. 1 e 3). Esses metabólitos envolvidos na via do ascorbato, indicando que a superexpressão do gene VTC4, pode estar modulando esta via, ou seja, a inserção do gene VTC4 pode desviar o metabolismo para a produção desses compostos em plântulas germinadas em condição controle em alguns eventos transgênicos.

O manitol também estava diferencialmente acumulado nos eventos 3, 4 e 5, que possuem expressão mais alta da VTC4.

Apesar da inserção do gene da via do mio-inositol, notou-se uma diminuição deste poliol em alguns eventos transgênicos (Figura 17).

Também é importante ressaltar que não foi possível observar acúmulo de compostos iguais em todas as linhagens transgênicas, sendo que as linhagens transgênicas acumulam compostos diferentes entre si, não havendo um metabólito marcador muito claro para a inserção do gene na condição controle.

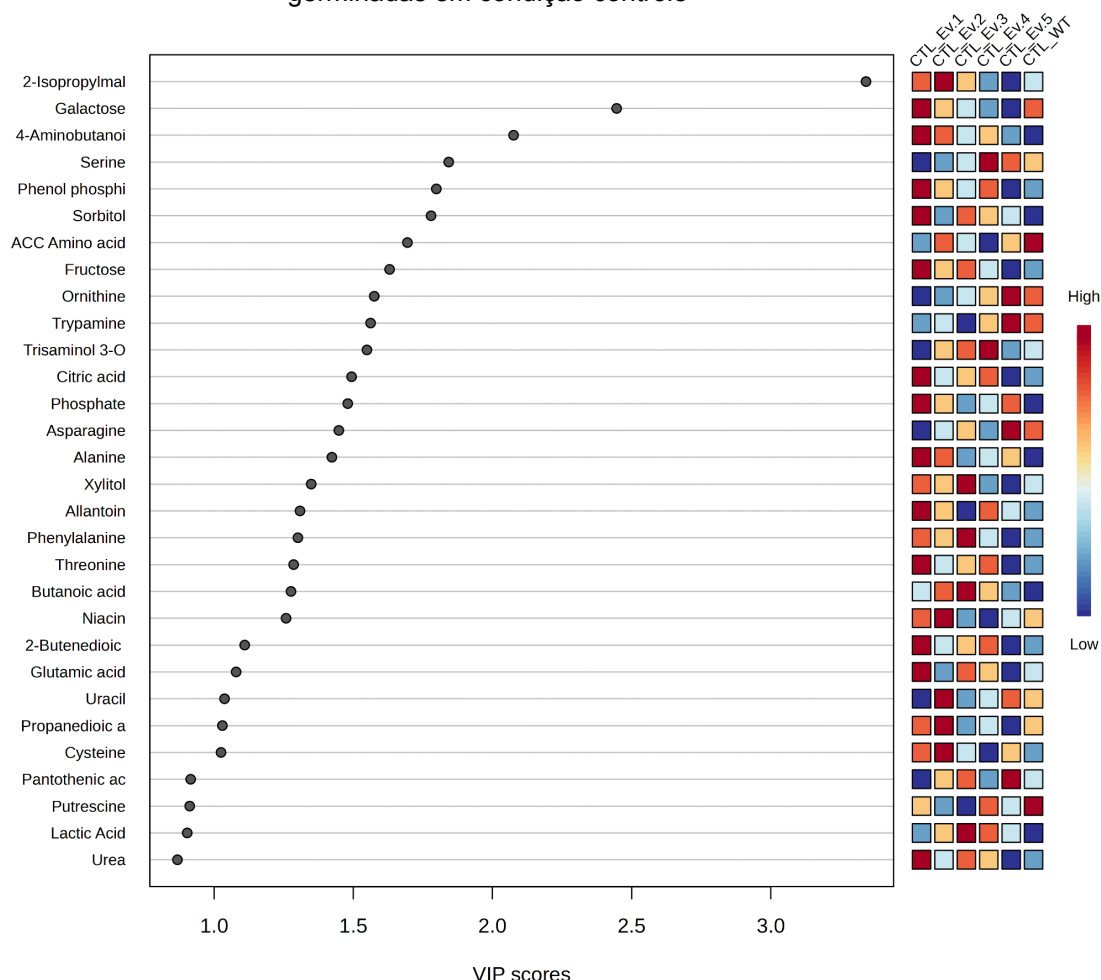
Figura 17 - Perfil metabólico na condição de controle de plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio de desenvolvimento de *Setaria viridis*



Nota-se através da análise de PLS-DA (figura 18), que os metabólitos mais

fortemente correlacionados com todas as linhagens transgênicas quando comparadas à linhagem selvagem são o sorbitol, GABA (Ácido 4-aminobutanóico), a frutose, a alanina, o ácido butanóico e o ácido láctico.

Figura 18 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de *Setaria viridis* germinadas em condição controle



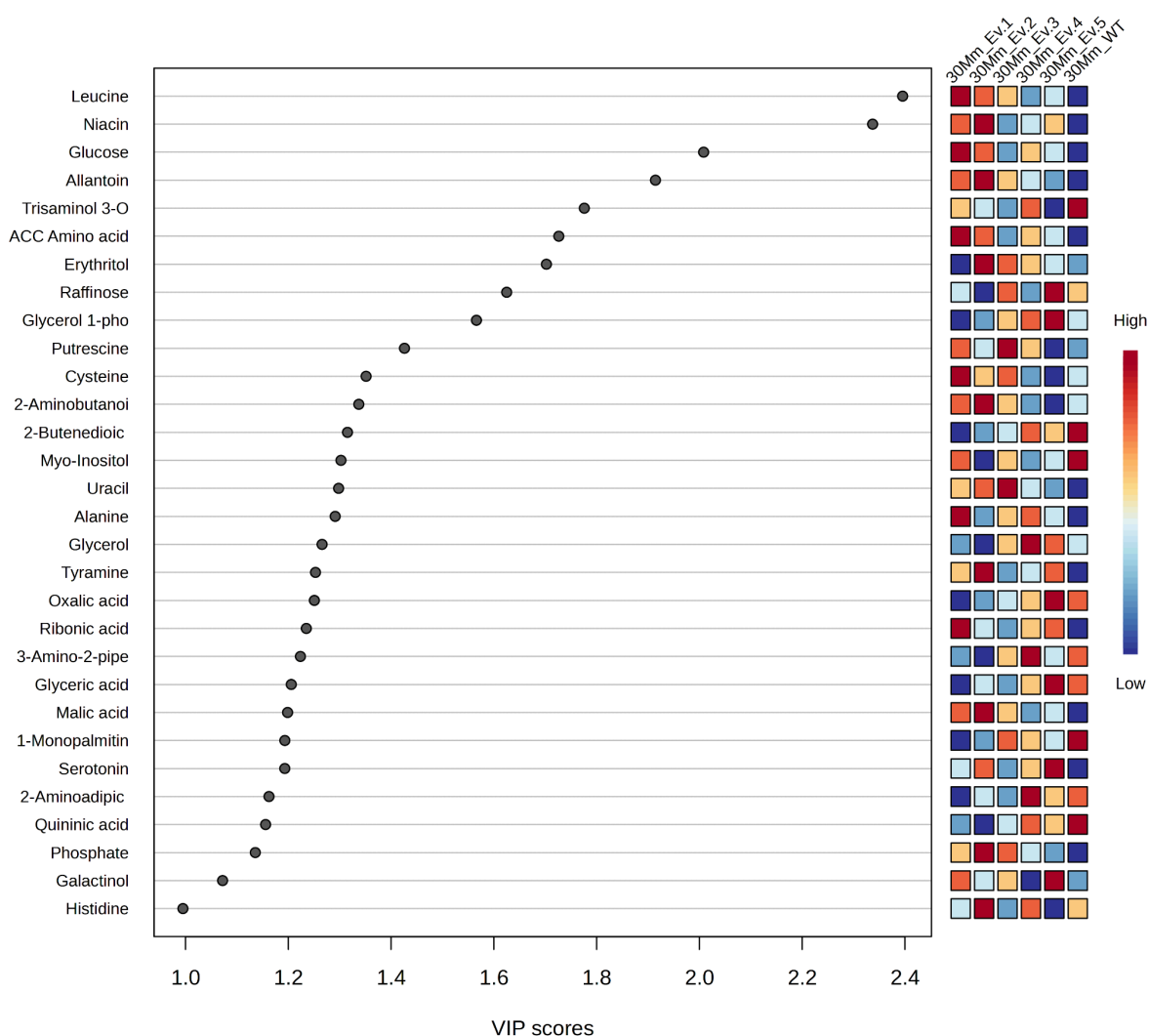
Em 30 mM de cloreto de sódio nota-se uma alteração dos compostos acumulados entre as linhagens estudadas. O *Heatmap* dos metabólitos (figura 19) indica um aumento de niacina, uracila, prolina, galactinol, leucina, beta alanina, serotonina, ácido aspártico, glicose e ácido ribônico, na maior parte dos eventos transformados e manitol e xilitol em alguns eventos transgênicos. A linhagem selvagem acumulou mais mio-inositol, oxoprolina, ornitina, trisaminol e glicina quando comparada às linhagens transgênicas.

Figura 19 - Perfil metabólico de plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio suplementado com 30mM de NaCl



Nota-se através da análise de PLS-DA (figura 20), que os metabólitos mais fortemente correlacionados com todas as linhagens transgênicas quando comparadas à linhagem selvagem são: leucina, niacina, glicose e alantoína. A rafinose tem maior correlação com os eventos 3 e 5, e o galactinol com os eventos 1, 3 e 5 quando comparados ao WT, mas os outros eventos mostraram menor correlação com esses metabólitos.

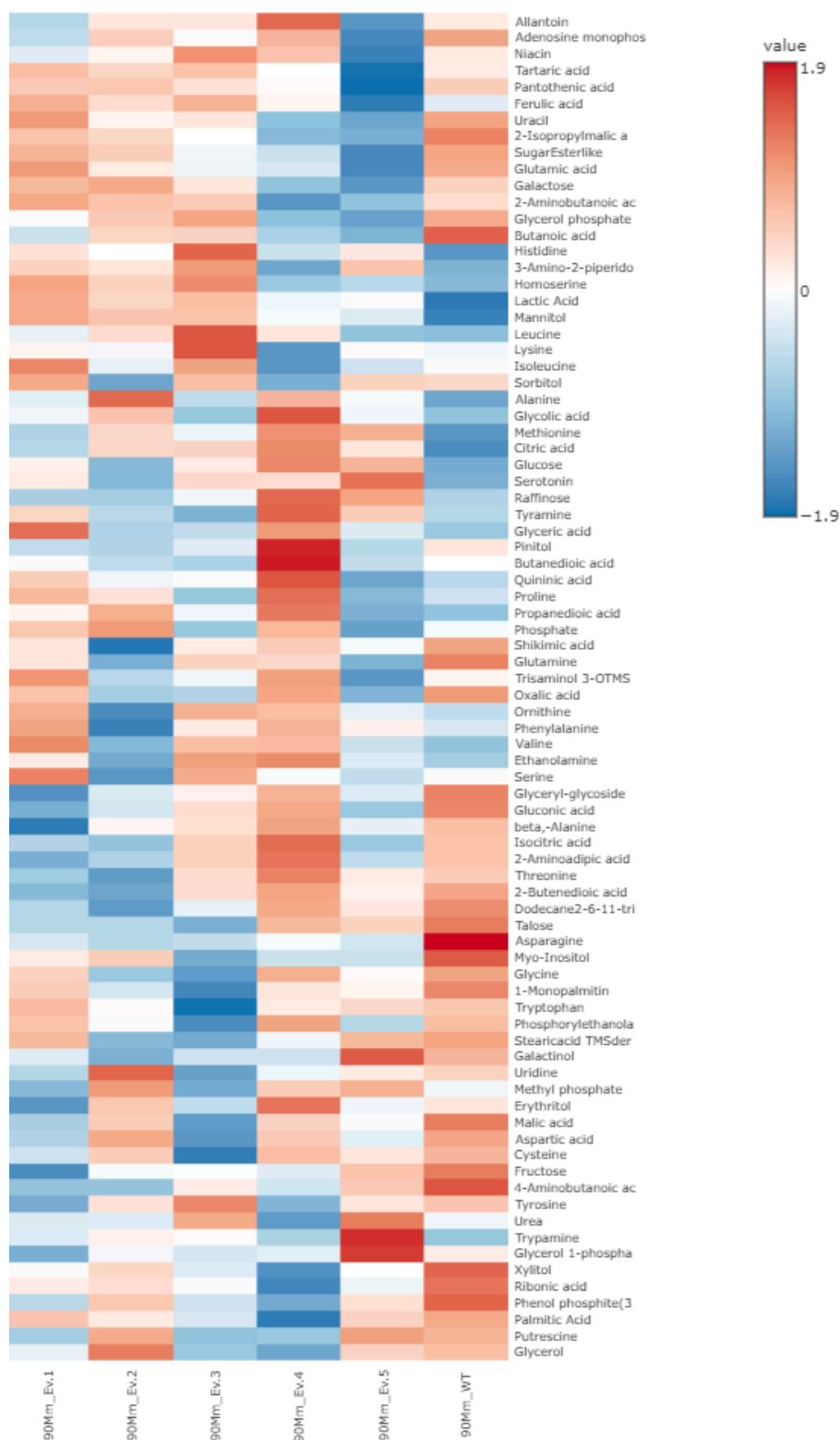
Figura 20 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio suplementado com 30 mM de NaCl



No tratamento de 90 mM de NaCl é possível perceber um maior acúmulo de aminoácidos nas linhagens transgênicas, como, por exemplo, histidina, homoserina, lisina, entre outros. Além disso, outros compostos são acumulados nas plântulas transgênicas, como o ácido cítrico, ácido ferúlico, ácido lático e manitol. É importante

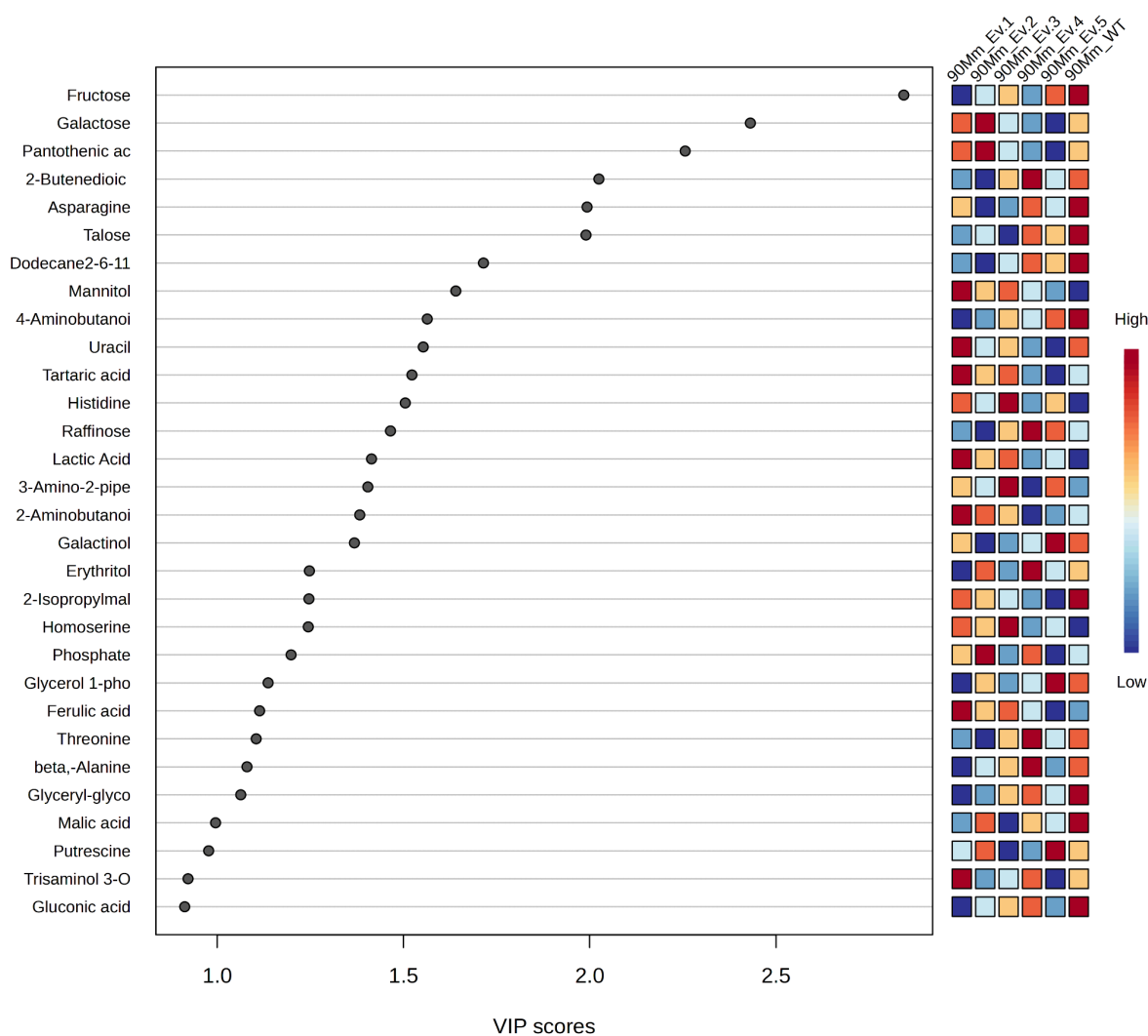
ressaltar que a linhagem selvagem tem maior acúmulo de mio-inositol. A rafinose foi mais acumulada nos eventos 4 e 5 quando comparados ao WT, a prolina nos eventos 1, 2 e 4 e o pinitol no evento 4 (figura 21).

Figura 21 - Perfil metabólico de plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio suplementado com 90mM de NaCl



Em 90 mM os compostos mais altamente correlacionados com as linhagens transgênicas encontrados através da análise de PLS-DA (figura 22) foram o manitol, o ácido tartárico, a histidina, a rafinose, a homoserina e o ácido láctico.

Figura 22 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio suplementado com 90 mM de NaCl



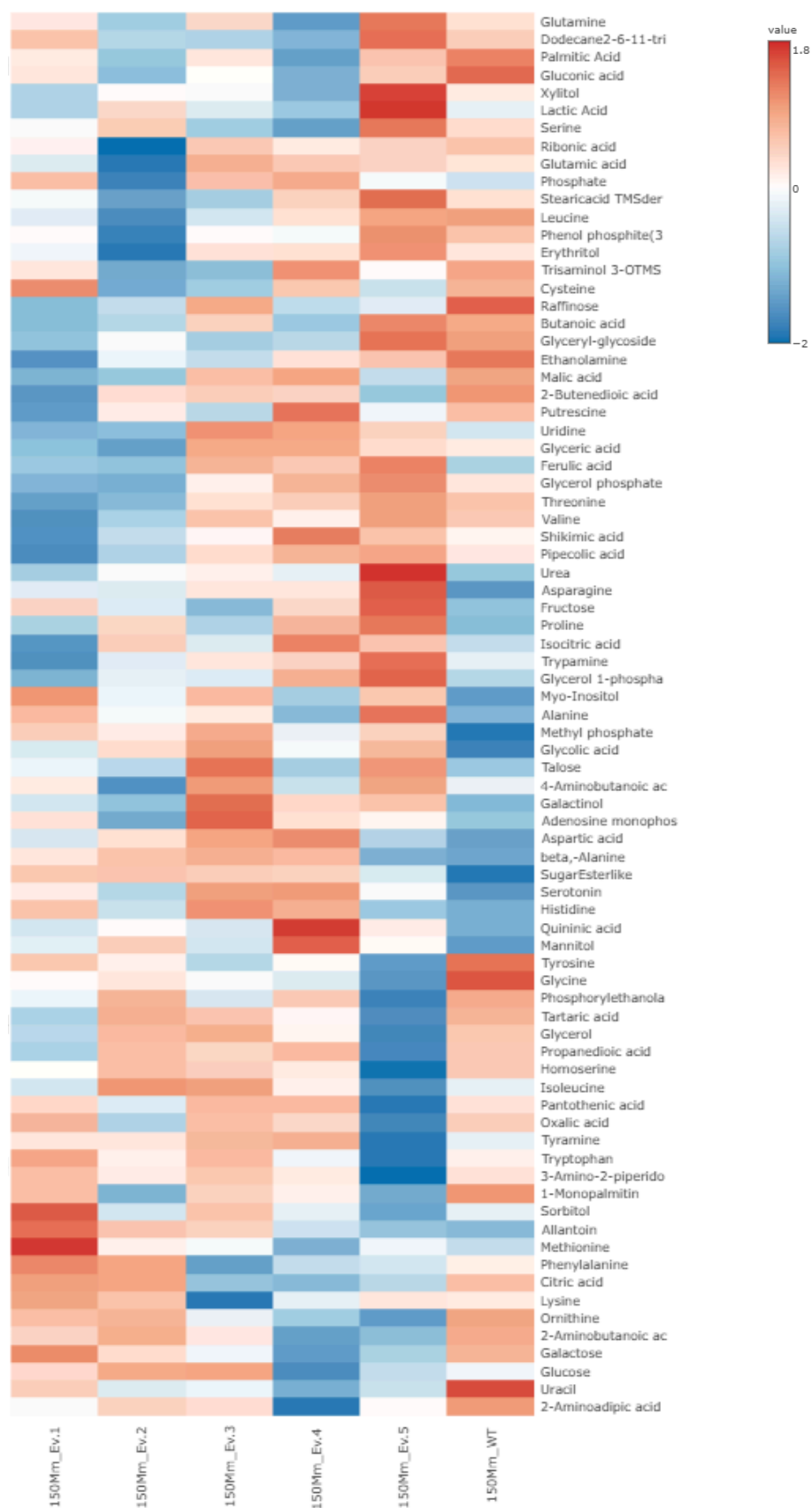
O ácido glucônico foi mais acumulado nas plântulas selvagens na condição de estresse de 90 mM de NaCl, enquanto o ácido cítrico foi mais acumulado nas plantas transformadas.

Quando submetidas a 150mM de NaCl, houve maior acúmulo de asparagina, prolina, mio-inositol em todas as linhagens transgênicas quando comparadas à linhagem selvagem e acúmulo de ácido glicólico e galactinol em diversos eventos. Também houve maior acúmulo de xilitol na linhagem 5 (Figura 23) e de ácido ferúlico

nas linhagens 3, 4 e 5.

É relevante mencionar que há maior acúmulo de ácido glucônico e de rafinose na linhagem selvagem do que nas linhagens transgênicas.

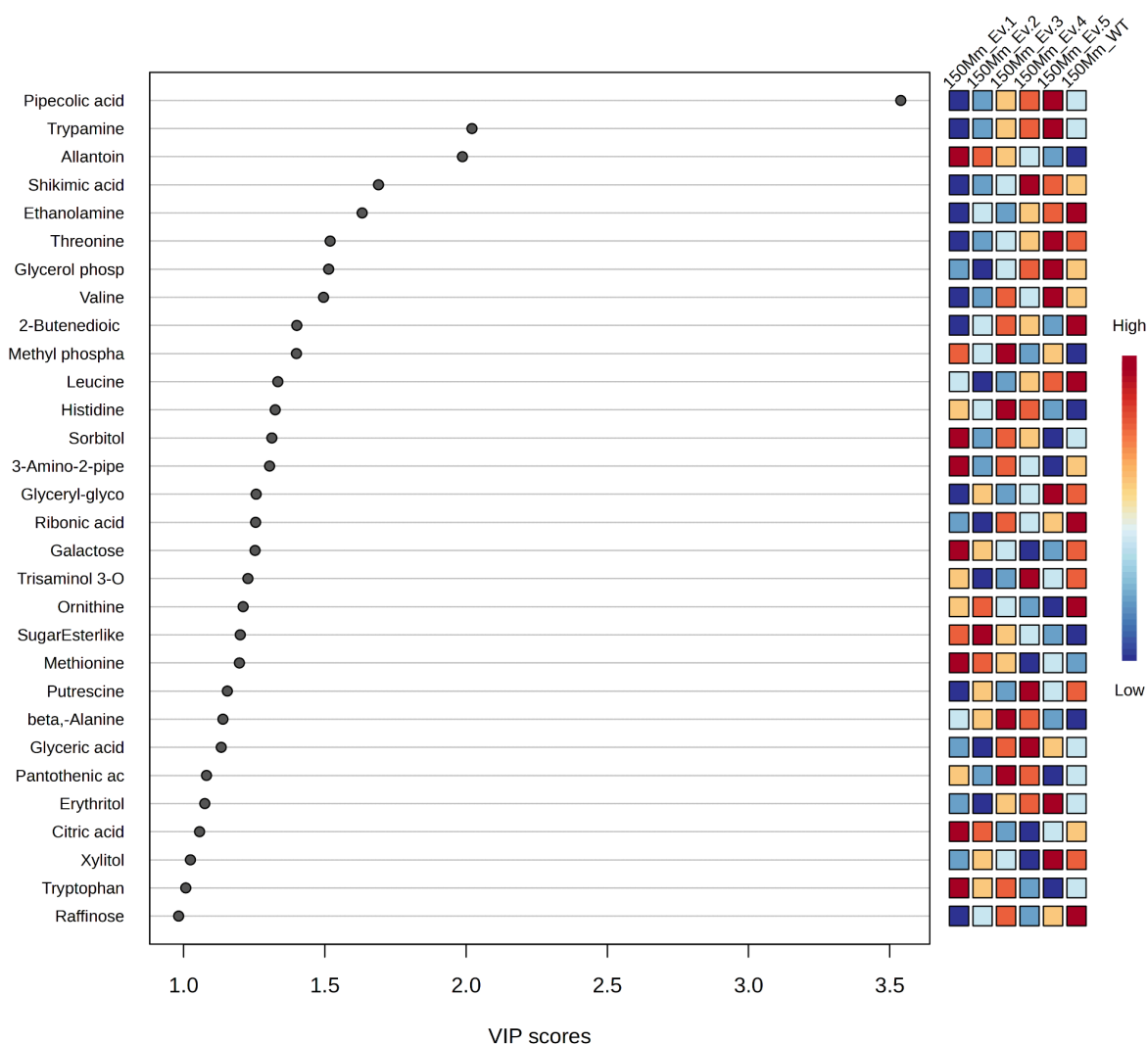
Figura 23 - Perfil metabólico de plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio suplementado com 150mM de NaCl



A PLS-DA (figura 24) indica que os dois principais compostos para a separação dos grupos foram o ácido pipecólico a tripamina (derivada do triptofano), ambos compostos possuem alta correlação com os eventos 3, 4 e 5. O ácido glicérico e o eritritol também possuem alta correlação com esses eventos.

Ademais, outros compostos com alta correlação com os eventos transgênicos foram, alantoína, metil fosfato, histidina, sorbitol, metionina, beta alanina e triptofano.

Figura 24 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plântulas de *Setaria viridis* germinadas em meio suplementado com 150 mM de NaCl



Verificou-se que em plântulas o MI e seus derivados foram acumulados principalmente na condição de estresse mais severas de 90 mM e 150 mM de NaCl. Na condição controle houve acúmulo de sorbitol em todos os eventos e de ácido glucônico, manitol e xilitol em grande parte dos eventos transformados quando

comparados a linhagem WT. Em 30mM houve acúmulo de galactinol em quatro eventos e de diversos polióis como sorbitol, glicerol e manitol em diferentes eventos. Já na condição de 90mM a rafinose está aumentada em três eventos, o manitol está acumulado em todos os eventos e o sorbitol está em maior quantidade em três eventos. Na condição de estresse mais severa o mio-inositol o galactinol e o manitol estão aumentados em todos os eventos, (Tabela 1).

Tabela 1 - Alteração da concentração de MI e de compostos relacionados com a via da VTC4 identificados na análise metabólica de plântulas

Tratamento	Composto	Plântulas				
		Ev.1	Ev.2	Ev.3	Ev.4	Ev.5
Controle	Mio-inositol	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Rafinose	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Galactinol	NID	NID	NID	NID	NID
	Xilitol	Maior	Maior	Maior	Menor	Menor
	Glicerol	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Sorbitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Manitol	Menor	Menor	Maior	Maior	Maior
	Galactose	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Ácido glucônico	Menor	Maior	Maior	Maior	Menor
30 mM NaCl	Mio-inositol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Rafinose	Menor	Menor	Maior	Menor	Maior
	Galactinol	Maior	Maior	Maior	Menor	Maior
	Xilitol	Menor	Menor	Menor	Maior	Menor
	Glicerol	Maior	Menor	Maior	Maior	Maior
	Sorbitol	Maior	Menor	Maior	Maior	Menor
	Manitol	Maior	Maior	Maior	Menor	Maior
	Galactose	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Ácido glucônico	Maior	Maior	Menor	Menor	Menor
90 mM NaCl	Mio-inositol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Rafinose	Menor	Menor	Maior	Maior	Maior
	Galactinol	Menor	Menor	Menor	Menor	Maior
	Xilitol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Glicerol	Menor	Maior	Menor	Menor	Menor
	Sorbitol	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior
	Manitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Galactose	Maior	Maior	Menor	Menor	Menor
	Ácido glucônico	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
150 mM NaCl	Mio-inositol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Rafinose	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Galactinol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Xilitol	Menor	Menor	Menor	Maior	Menor
	Glicerol	Menor	Maior	Maior	Menor	Menor
	Sorbitol	Maior	Menor	Maior	Menor	Menor
	Manitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Galactose	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Ácido glucônico	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor

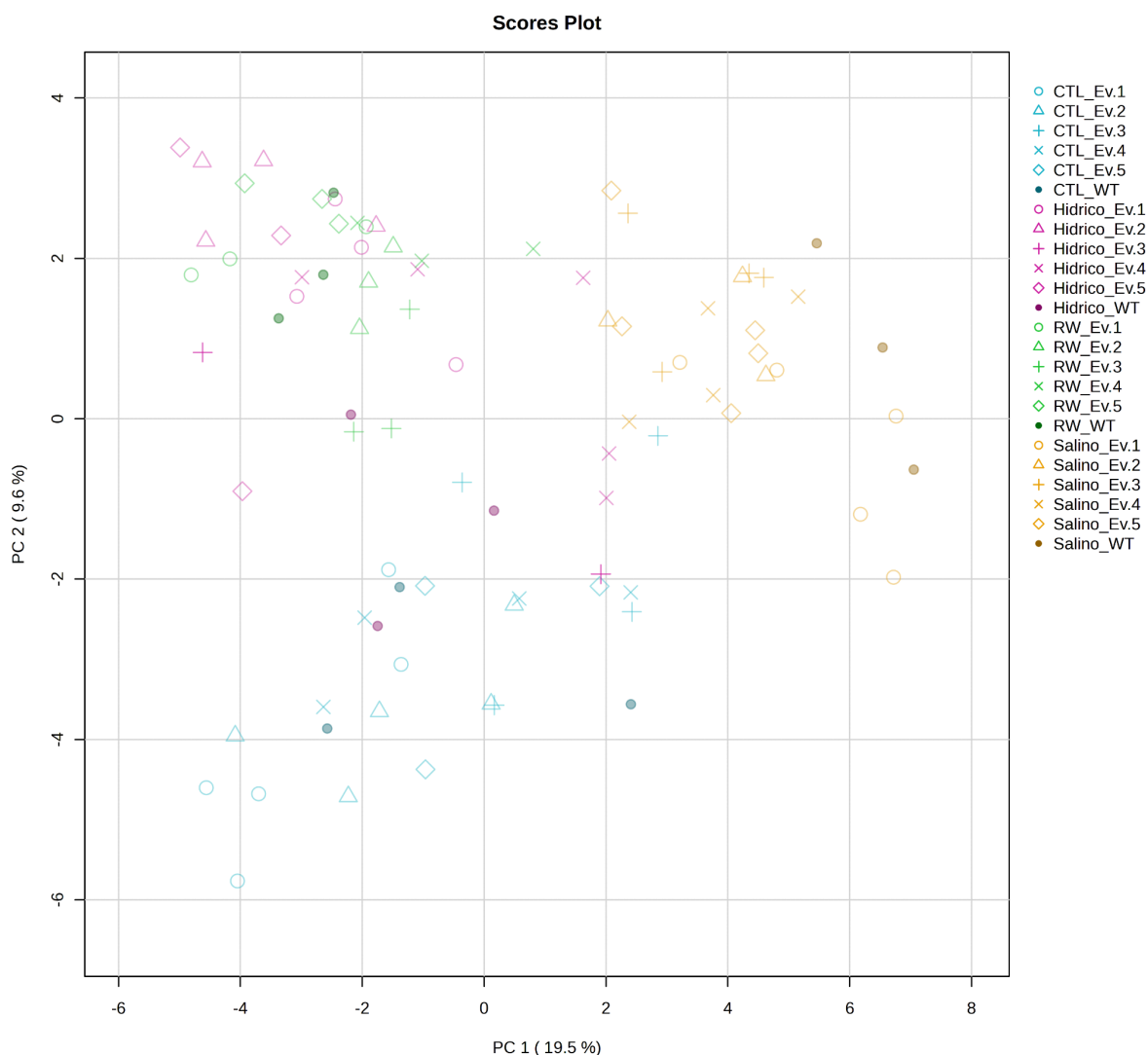
Comparação feita entre a planta selvagem e transformada
NID - Composto não identificado na análise

5.6.2. Plantas

Plantas no estágio pré-*booting* foram submetidas a estresse hídrico e salino para analisar o impacto da superexpressão de *CsVTC4* sob diferentes estresses osmóticos. As mudanças globais no perfil metabólico dos eventos sob estresse hídrico ou salino podem ser visualizadas pela Análise de Componentes Principais (PCA). É possível observar que as linhagens transgênicas têm perfis metabólicos distintos do tipo selvagem.

O perfil metabólico somente sofreu alteração nas condições de estresse, (colorido em rosa para o estresse hídrico e em laranja para o estresse salino). Já nas condições de controle e após a reidratação das plantas o perfil das linhagens transgênicas e da linhagem selvagem não mostrou distinção através da análise de PCA, indicando que a inserção do gene afeta o metabolismo da planta principalmente nos momentos em que a resposta ao estresse é mais latente (figura 25).

Figura 25 - PCA do perfil metabólico das plantas de *Setaria viridis* cultivadas em diferentes concentrações regimes de estresse osmótico



CTL - Condição controle, Hídrico - Estresse hídrico de 72 horas com umidade do solo abaixo de 5%,
RW - Recuperação do estresse hídrico 24 horas após reidratação e salino - Estresse salino.

Outro ponto relevante é que o perfil metabólico das plantas recuperadas após o estresse hídrico de todas as linhagens, inclusive da selvagem, é bastante semelhante ao perfil das linhagens transgênicas, mostrando que as plantas selvagens conseguem alterar seu metabolismo após a reidratação, mas as plantas transgênicas possuem a capacidade de modular o metabolismo mesmo durante o estresse hídrico, sendo assim tem maior capacidade de aclimação durante períodos de seca.

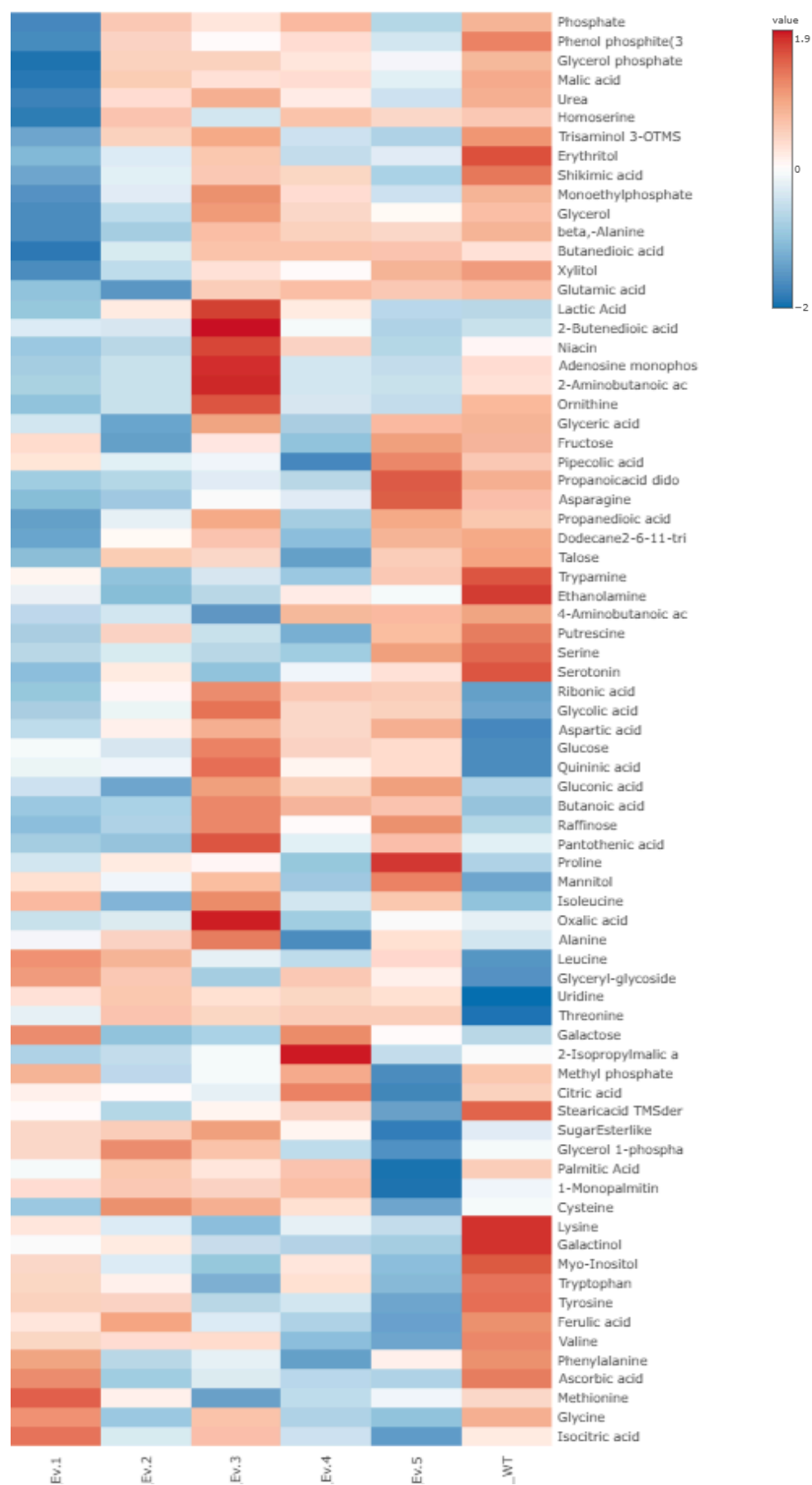
Ao analisar os compostos acumulados em condições de controle, a linhagem transgênica do evento 3 apresentou um perfil metabólico diferente do tipo selvagem

e acumulou níveis mais altos de alguns ácidos orgânicos e aminoácidos, como ácido láctico, ácido oxálico, ornitina, alanina e niacina (figura 26).

Outros compostos que estão mais acumulados nas linhagens transgênicas são: treonina, uridina, ácido ribônico, ácido glicólico, ácido glucônico, ácido aspártico, glicose, rafinose, manitol e monopalmitina.

O mio-inositol e o galactinol foram encontrados em menor quantidade em todos os eventos transgênicos, quando comparados à linhagem selvagem.

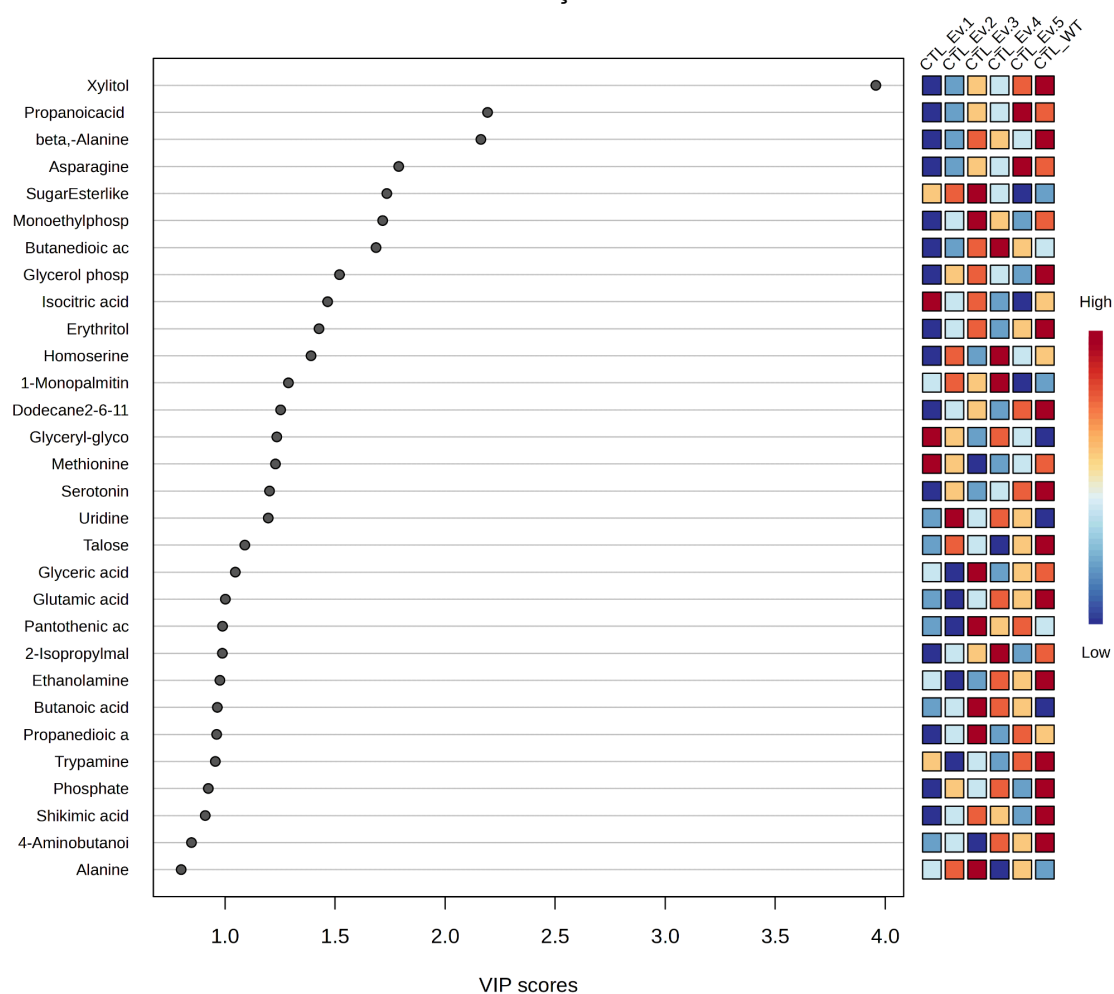
Figura 26 - Perfil metabólico de plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo na condição de controle



A análise de PLS-DA (figura 27) indicou que os compostos relevantes para separação dos grupos foram o xilitol, o ácido propanóico, a beta-alanina e a asparagina, esses compostos têm correlação alta com a linhagem selvagem e baixa com a maior parte das linhagens transgênicas.

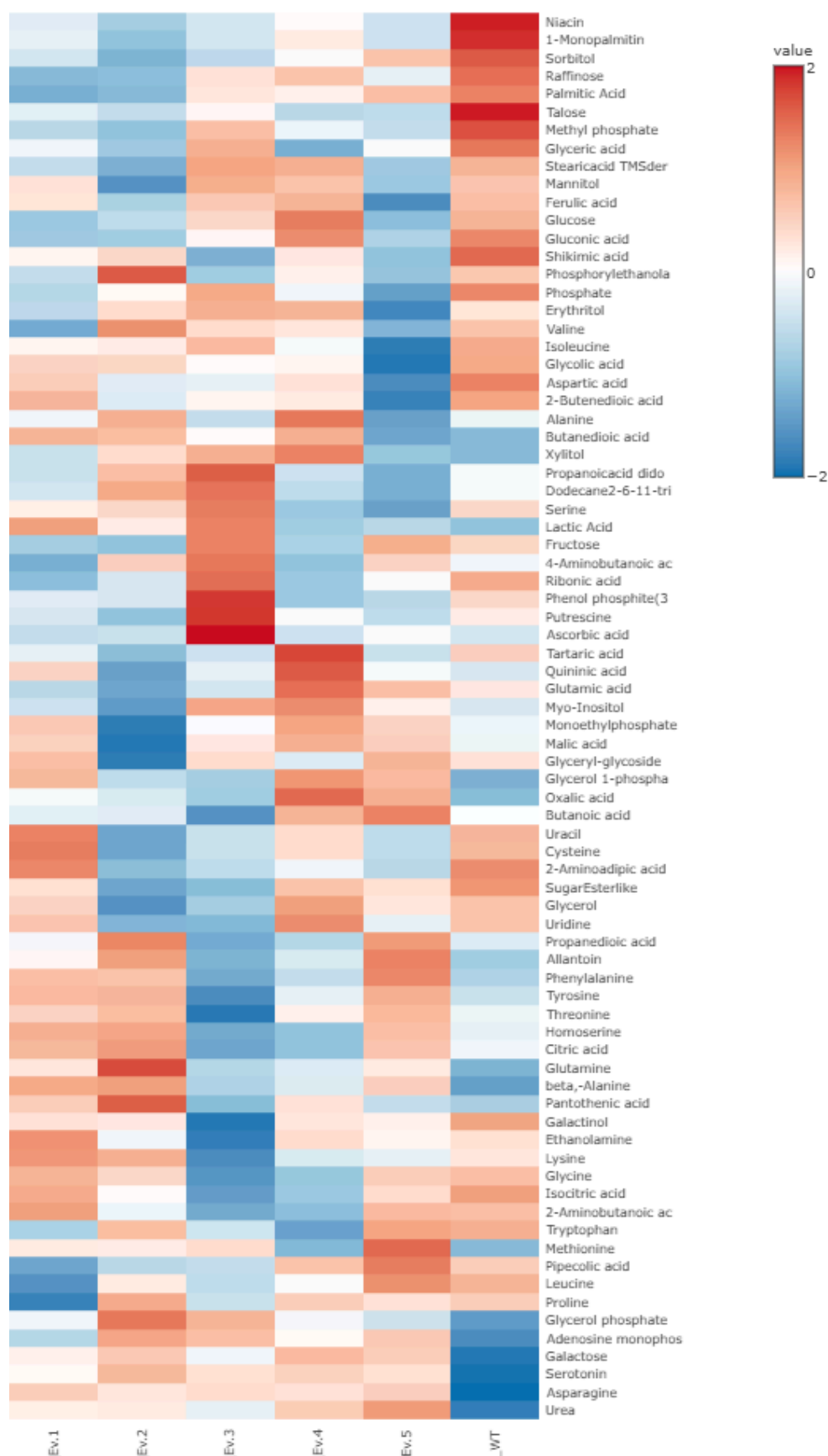
Já os compostos com maior correlação com diversas linhagens transformadas foram açúcares éster, ácido butenodiólico, ácido butanóico, monopalmitina, uridina, ácido pantotênico e alanina.

Figura 27 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo sob condição controle



Diversos eventos das plantas transgênicas submetidas ao estresse hídrico apresentaram acúmulo de alanina, ácido butenodiólico, xilitol, ácido láctico, galactose, serotonina, asparagina e mio-inositol quando comparado à linhagem transgênica (figura 28).

Figura 28 - Perfil metabólico de plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo na condição de estresse hídrico

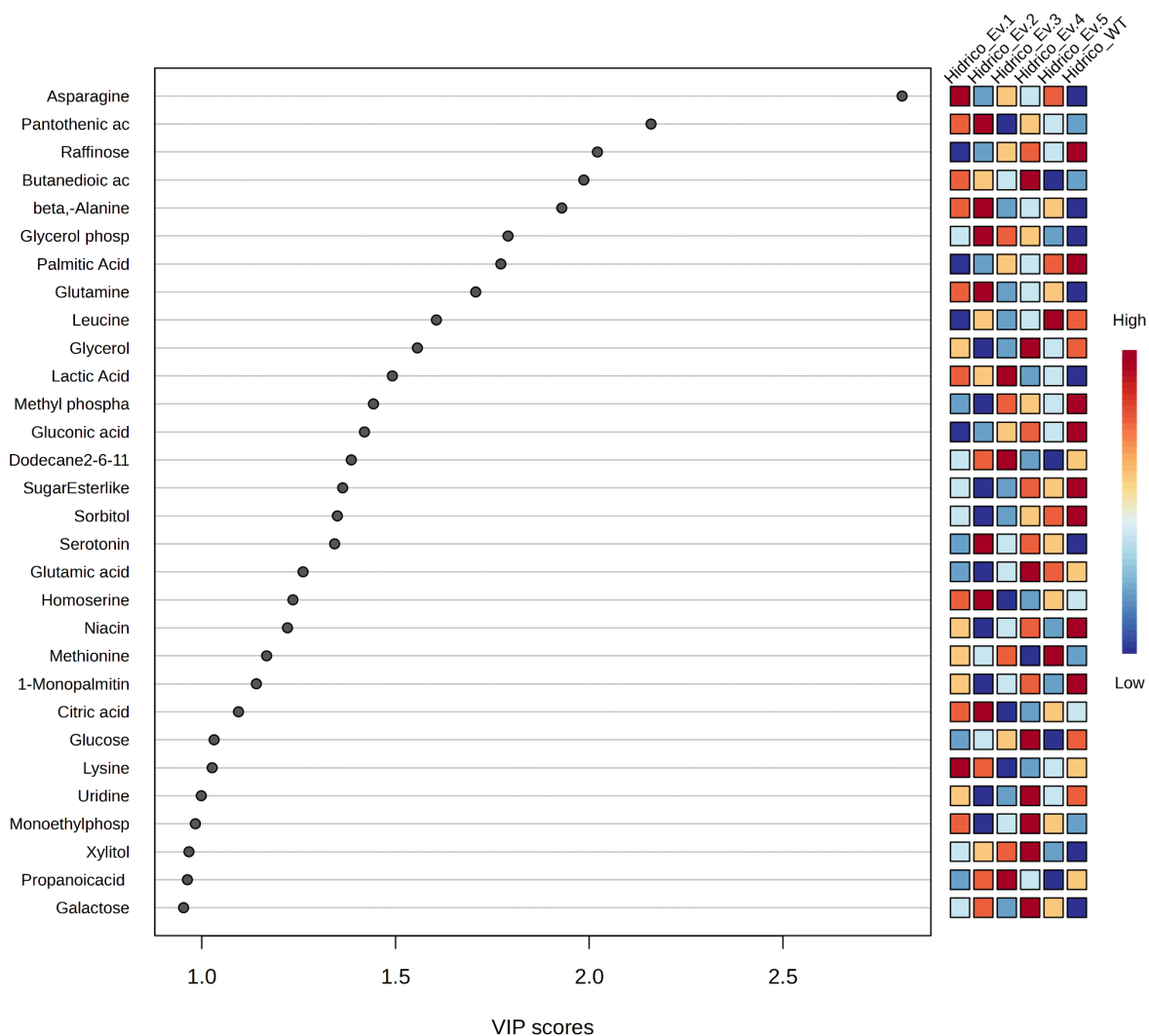


É interessante notar que o evento 3 mostra um grande acúmulo de ácido ascórbico.

Ao se analisar os resultados da PLS-DA nota-se que os principais compostos para a separação dos grupos foram a asparagina e ácido pantotênico, ácido butenodiólico, beta alanina, glicerol fosfato, glutamina, ácido láctico, ácido cítrico, serotonina, metionina, xilitol e galactose, que foram acumulados em diversas linhagens transgênicas.

Já a rafinose e o ácido glucônico possuem maior correlação com a linhagem selvagem (Figura 29).

Figura 29 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo sob condição de estresse hídrico

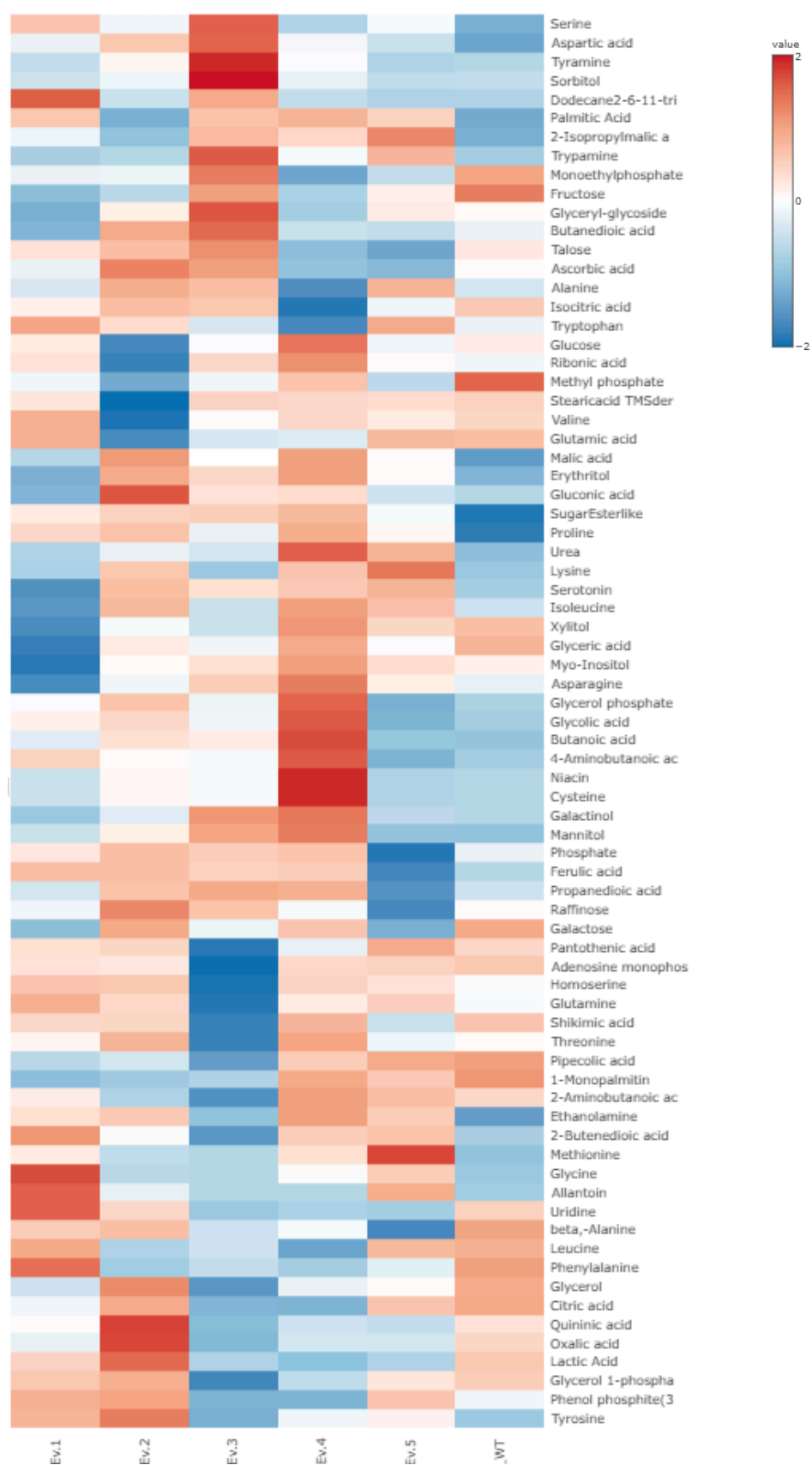


Após a reidratação e recuperação do estresse hídrico, observaram-se níveis mais altos nas plantas transgênicas de ácido palmítico, ácido butenodiólico, talose,

ácido ascórbico, alanina, triptofano, ácido ribônico, eritritol, prolina, ácido glucônico, serotonina, asparagina, ácido glicólico, galactinol, manitol, ácido ferúlico, rafinose, entre outros compostos.

No entanto, cada linhagem apresentou acúmulo de compostos diferentes, possivelmente porque o perfil metabólico no geral foi similar ao da planta selvagem, não havendo um metabólito marcador para a diferenciação do metabolismo das plantas transformadas (Figura 30).

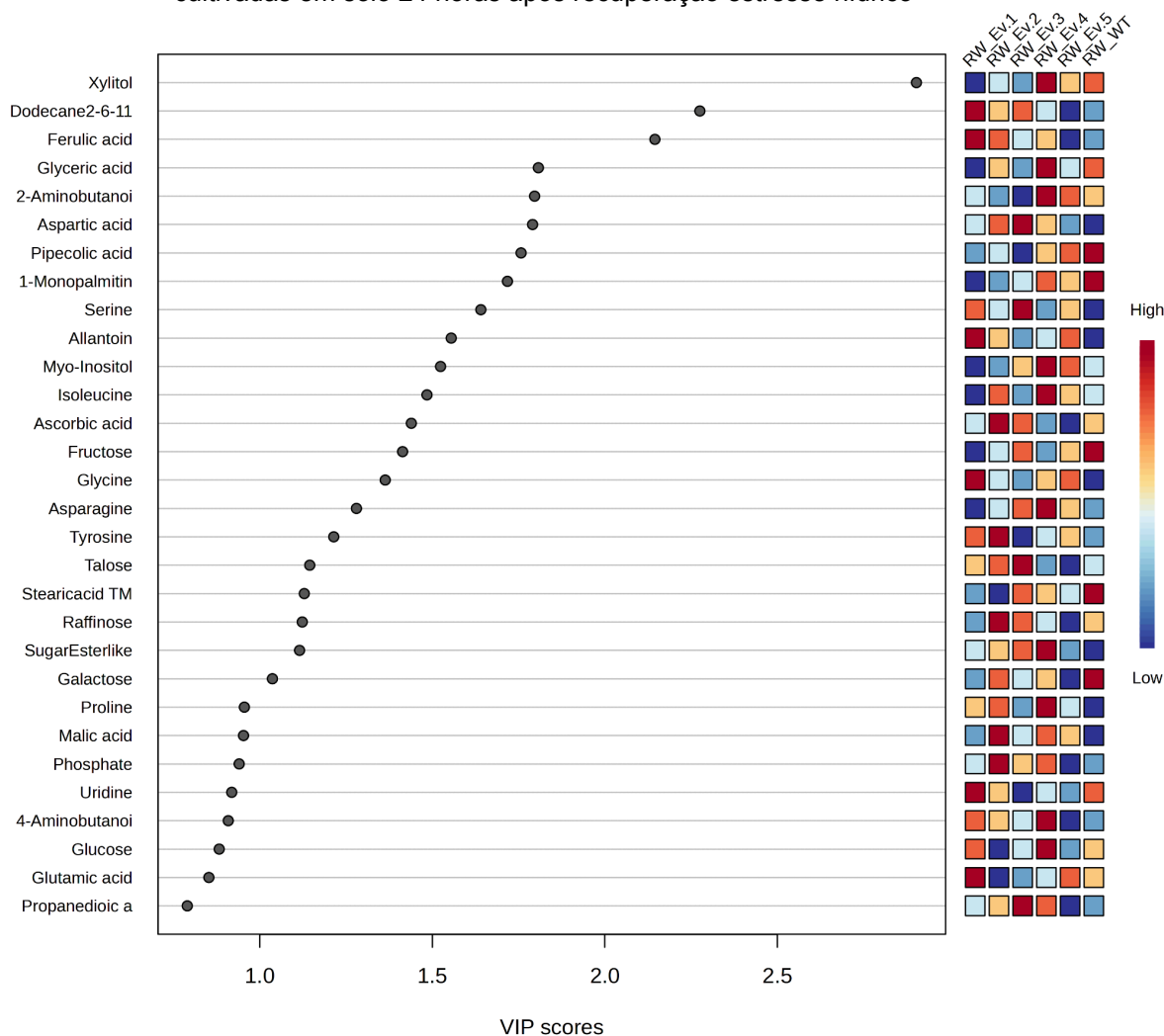
Figura 30 - Perfil metabólico de plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo 24 horas após recuperação estresse hídrico



O resultado da PLS-DA (figura 31) mostra que os principais compostos para a separação dos grupos com alta correlação com as linhagens transgênicas foram o trimetil dodecano, mio-inositol, ácido ferúlico, ácido aspártico, serina, alantoína, glicina, asparagina, tirosina, talose, prolina, ácido málico, entre outros.

A rafinose e o ácido ascórbico possuem alta correlação com as linhagens transgênicas dos eventos 2 e 3 e uma correlação média com a linhagem selvagem.

Figura 31 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo 24 horas após recuperação estresse hídrico



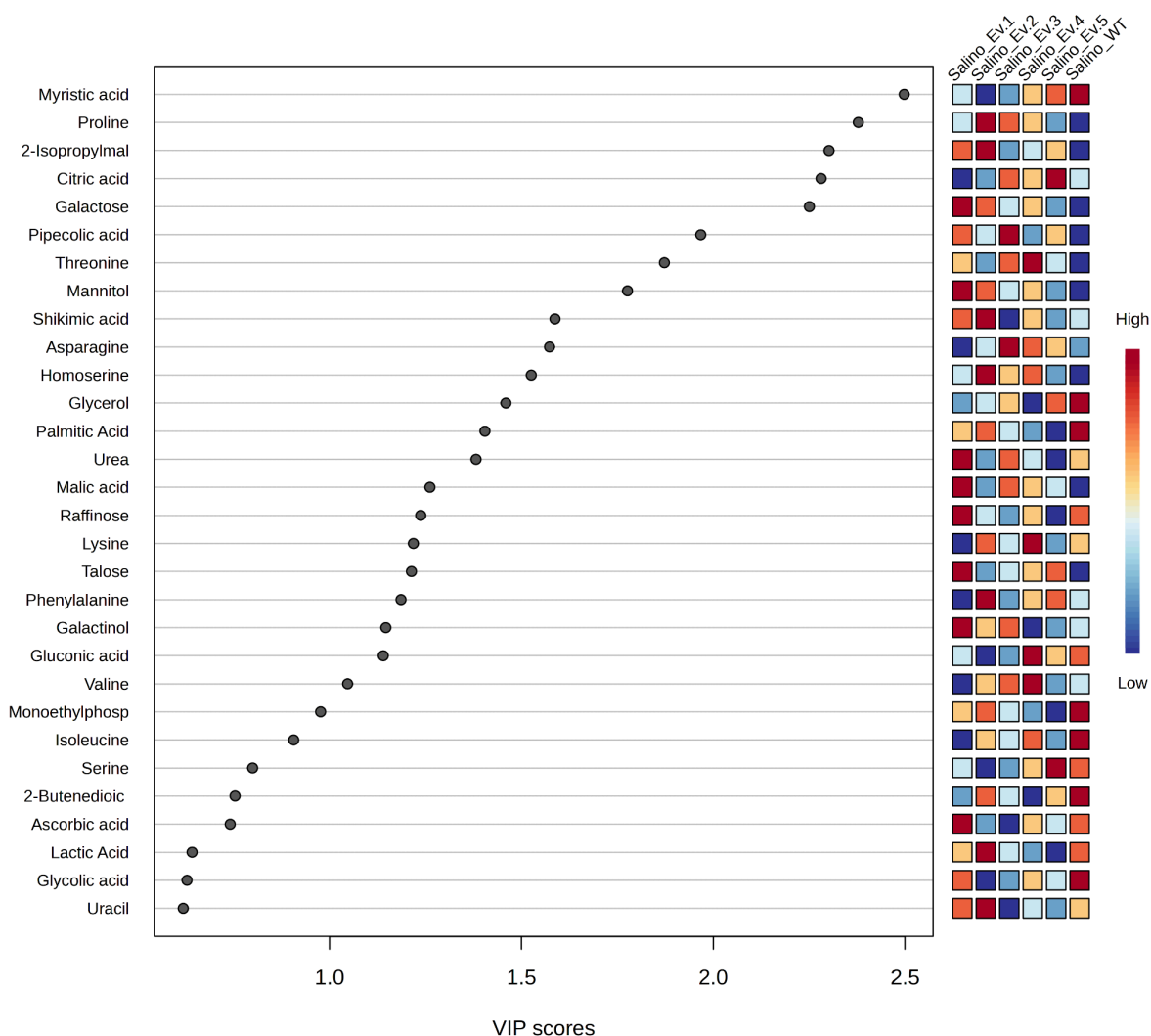
Na condição de estresse salino, grande parte das linhagens transgênicas acumularam mais prolina, frutose, talose, ácido málico, alanina, treonina, homoserina, ácido pipecólico, manitol, galactose, galactinol e serotonina. Contudo, a maior parte das linhagens transformadas apresentaram menos rafinose, mio-inositol e ácido glucônico (figura 32).

Figura 32 - Perfil metabólico de plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo na condição de estresse salino



A análise de PLS-DA indicou que os metabólitos relevantes para a separação dos grupos foram: ácido mirístico, glicerol e ácido palmítico, que apresentaram alta correlação com a linhagem selvagem e a prolina, ácido cítrico, galactose, ácido pipercolico, treonina, manitol, ácido chiquímico, asparagina, homoserina, ácido málico, talose, fenilalanina e galactinol que tem correlação alta com algumas linhagens transgênicas (figura 33).

Figura 33 - Principais metabólitos identificados pelo PLS-DA em plantas de *Setaria viridis* cultivadas em solo após estresse salino



Ao se analisar a tabela de metabólitos que podem ser alterados pela inserção da *CsVTC4* é possível perceber um maior acúmulo desses compostos nas linhagens transgênicas principalmente após a reidratação. Na condição controle há acúmulo de manitol em todos os eventos e de rafinose, galactose e ácido glucônico na maior

parte dos eventos. Durante o estresse hídrico é possível notar aumento da galactose e do xilitol em todos os eventos e do ácido ascórbico nos eventos 3 e 5, além do mio-inositol nos 3 eventos com maior superexpressão da VTC4. Após a recuperação do estresse hídrico nota-se aumento do galactinol e mio-inositol em todos os eventos, exceto no evento 1, além do acúmulo de manitol, sorbitol e ácido glucônico em grande parte dos eventos. Já durante o estresse salino houve aumento do manitol e galactose em todos os eventos e do galactinol em grande parte dos eventos (Tabela 2).

Tabela 2 - Alteração da concentração de MI e de compostos relacionados com a via da VTC4 identificados na análise metabólica de plantas

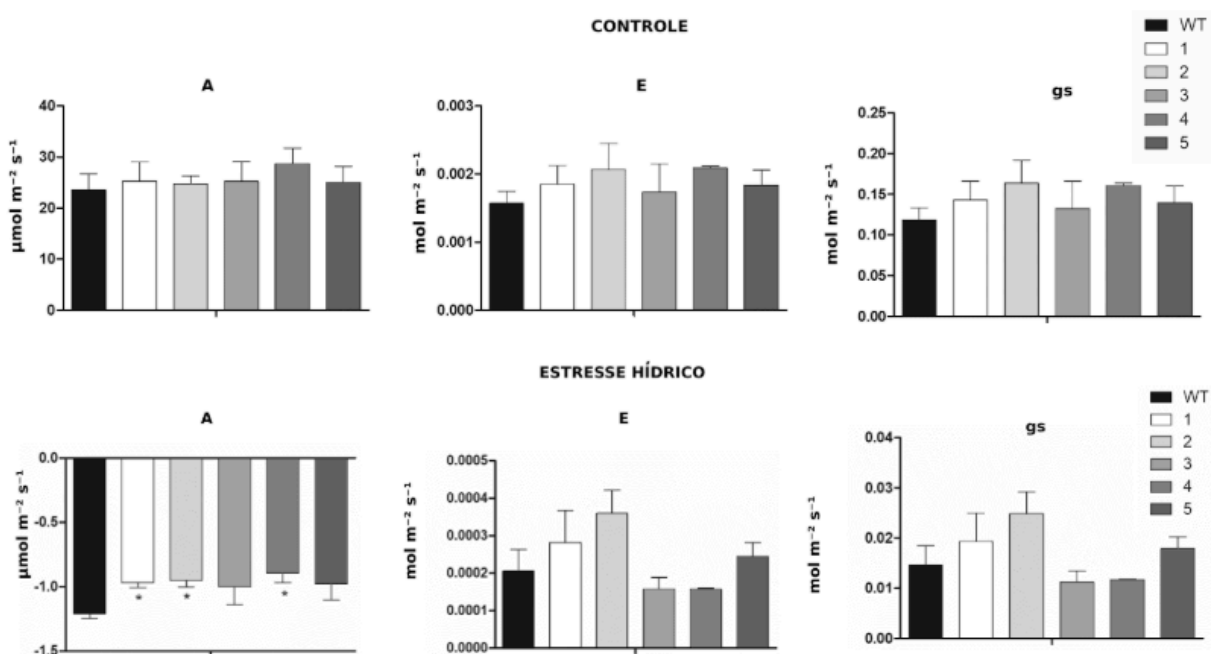
Tratamento	Composto	Ev.1	Ev.2	Ev.3	Ev.4	Ev.5
Controle	Mio-inositol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Rafinose	Menor	Maior	Maior	Maior	Maior
	Galactinol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Ácido Ascórbico	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Xilitol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Glicerol	Menor	Menor	Maior	Menor	Menor
	Sorbitol	NID	NID	NID	NID	NID
	Manitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Galactose	Maior	Menor	Maior	Maior	Menor
	Ácido glucônico	Maior	Menor	Maior	Maior	Maior
Estresse hídrico	Mio-inositol	Menor	Menor	Maior	Maior	Maior
	Rafinose	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Galactinol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Ácido Ascórbico	Menor	Menor	Maior	Menor	Maior
	Xilitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Glicerol	Menor	Menor	Menor	Maior	Menor
	Sorbitol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Manitol	Menor	Menor	Maior	Maior	Menor
	Galactose	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Ácido glucônico	Menor	Menor	Menor	Maior	Menor
Recuperação	Mio-inositol	Menor	Maior	Maior	Maior	Maior
	Rafinose	Menor	Maior	Maior	Menor	Menor
	Galactinol	Menor	Maior	Maior	Maior	Maior
	Ácido Ascórbico	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Xilitol	Menor	Menor	Maior	Menor	Menor
	Glicerol	Menor	Maior	Menor	Menor	Menor
	Sorbitol	Menor	Maior	Maior	Maior	Menor
	Manitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Menor
	Galactose	Menor	Maior	Menor	Menor	Menor
	Ácido glucônico	Menor	Maior	Maior	Maior	Menor
Estresse Salino	Mio-inositol	Menor	Maior	Menor	Menor	Menor
	Rafinose	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Galactinol	Maior	Maior	Maior	Menor	Menor
	Ácido Ascórbico	Maior	Menor	Menor	Menor	Menor
	Xilitol	Menor	Menor	Menor	Menor	Menor
	Glicerol	Menor	Menor	Menor	Menor	Maior
	Sorbitol	NID	NID	NID	NID	NID
	Manitol	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Galactose	Maior	Maior	Maior	Maior	Maior
	Ácido glucônico	Menor	Menor	Menor	Maior	Menor

Comparação feita entre a planta selvagem e transformada
NID - Composto não identificado na análise.

5.7. Análises de trocas gasosas

As plantas superexpressando o gene *CsVTC4* não mostraram alterações significativas na assimilação de carbono (A), taxa de transpiração (E), carbono e condutâncias estomáticas (Gs), na condição controle, contudo quando submetidas ao estresse hídrico as plantas transgênicas tiveram melhor desempenho na taxa de assimilação de carbono nos eventos 1, 2 e 4, quando comparadas a WT, sem alteração significativa nos outros parâmetros (Figura 34).

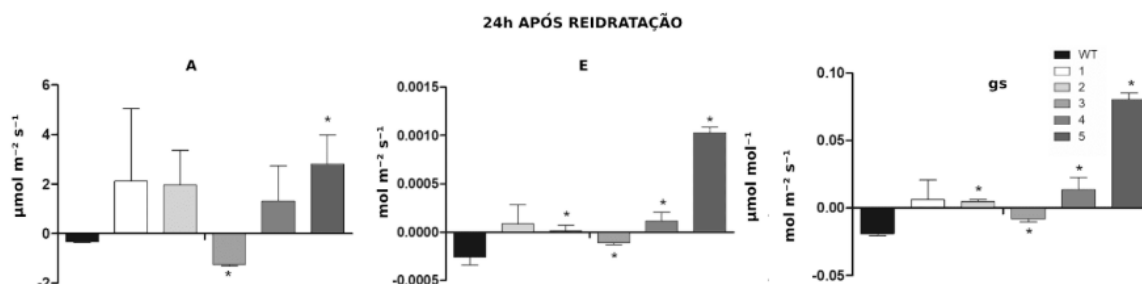
Figura 34 - Trocas gasosas das folhas em *Setaria viridis* em condição de controle e de estresse hídrico



Os dados são apresentados como média \pm SE de três replicatas biológicas. Diferenças significativas estimadas pelo teste de Tukey, são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

Após a reidratação, grande parte dos eventos transgênicos mostraram alteração em todos os parâmetros de trocas gasosas, tendo maior assimilação de carbono (exceto evento 3), maior transpiração e maior condutância estomática, o que indica uma recuperação mais vigorosa frente a condição de seca quando comparadas com a linhagem selvagem (Figura 35).

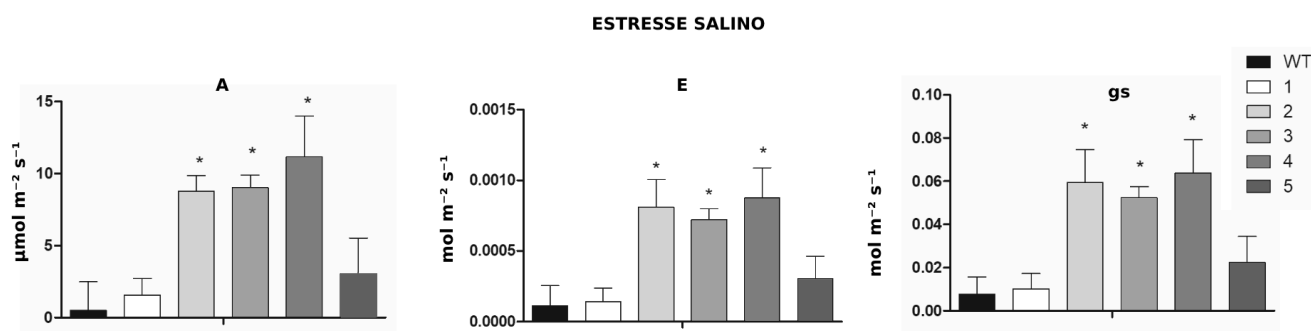
Figura 35 - Trocas gasosas das folhas em *Setaria viridis* 24h após recuperação do estresse hídrico



Os dados são apresentados como média \pm SE de três replicatas biológicas. Diferenças significativas estimadas pelo teste de Tukey, são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

Sob estresse salino, as plantas dos eventos 2, 3 e 4 apresentaram aumento significativo nos parâmetros de assimilação de carbono, transpiração e condutância estomática, quando comparados à linhagem selvagem. As linhagens transgênicas foram capazes de recuperar todos os níveis dos parâmetros de troca gasosa mais cedo do que as plantas selvagens. Isso pode ser explicado por uma maior capacidade de indução de mecanismos de proteção, devido à inserção do gene VTC4 (Figura 36).

Figura 36 - Trocas gasosas das folhas de *Setaria viridis* durante estresse salino



Os dados são apresentados como média \pm SE de três replicatas biológicas. Diferenças significativas estimadas pelo teste de Tukey, são indicadas por asteriscos ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Por meio das análises *in silico*, foi selecionada a sequência da *CsVTC4*, que faz parte da família de enzimas do PFAM00459, pois dados da literatura indicam efeitos protetores contra estresses abióticos relacionados a esse gene (Torabinejad *et al.*, 2009; Vílchez *et al.*, 2020).

Através do BLASTn, concluiu-se que as sequências provenientes da alga *Coccomyxa* apresentaram distância satisfatória em relação aos mesmos genes de *Setaria viridis*, tendo identidade de 69,79% para a sequência da *CsVTC4*. Isso é de grande interesse para evitar um efeito de feedback negativo, no qual a superexpressão de um gene leva à diminuição da sua própria expressão. Isso porque a *Setaria viridis* possui o gene selecionado em seu genoma e uma sequência com alta identidade poderia gerar esse efeito indesejado.

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

Para checar a inserção de uma única cópia foram selecionados somente os eventos que apresentaram padrão mendeliano correspondente (conforme descrito na seção 4.3), isso evita o efeito de feedback negativo devido à expressão exacerbada de múltiplas cópias. A adição de uma única cópia do transgene também é importante para que o fenótipo seja estável, já que a inserção de múltiplas cópias pode levar a geração de sementes de uma mesma planta com número de cópias do transgene diferente e consequentemente níveis de superexpressão genética diferentes a cada geração.

Além disso, como o local de inserção é aleatório, o transgene pode ser inserido em um gene endógeno, silenciando esse gene. Isso pode acarretar um fenótipo notado devido ao silenciamento do gene endógeno e não da inserção do transgene, por isso é necessário avaliar diversos eventos com adição de cópia única do transgene e notar se o fenótipo é estável.

As plântulas transgênicas de *Setaria viridis* superexpressando o gene *CsVTC4* demonstraram uma tolerância aumentada ao estresse salino, evidenciada por uma maior taxa de germinação, crescimento radicular, e acúmulo de biomassa em todas as condições de estresse avaliadas (0, 30, 90 e 150 mM de NaCl). Essas

plântulas apresentaram taxas de germinação até 55% superiores às plantas WT, além de crescimento radicular significativamente maior em todas as concentrações de NaCl, especialmente em 150 mM, que foi a condição de estresse mais severo. Os resultados foram observados em todos os eventos, independente do nível de superexpressão do gene.

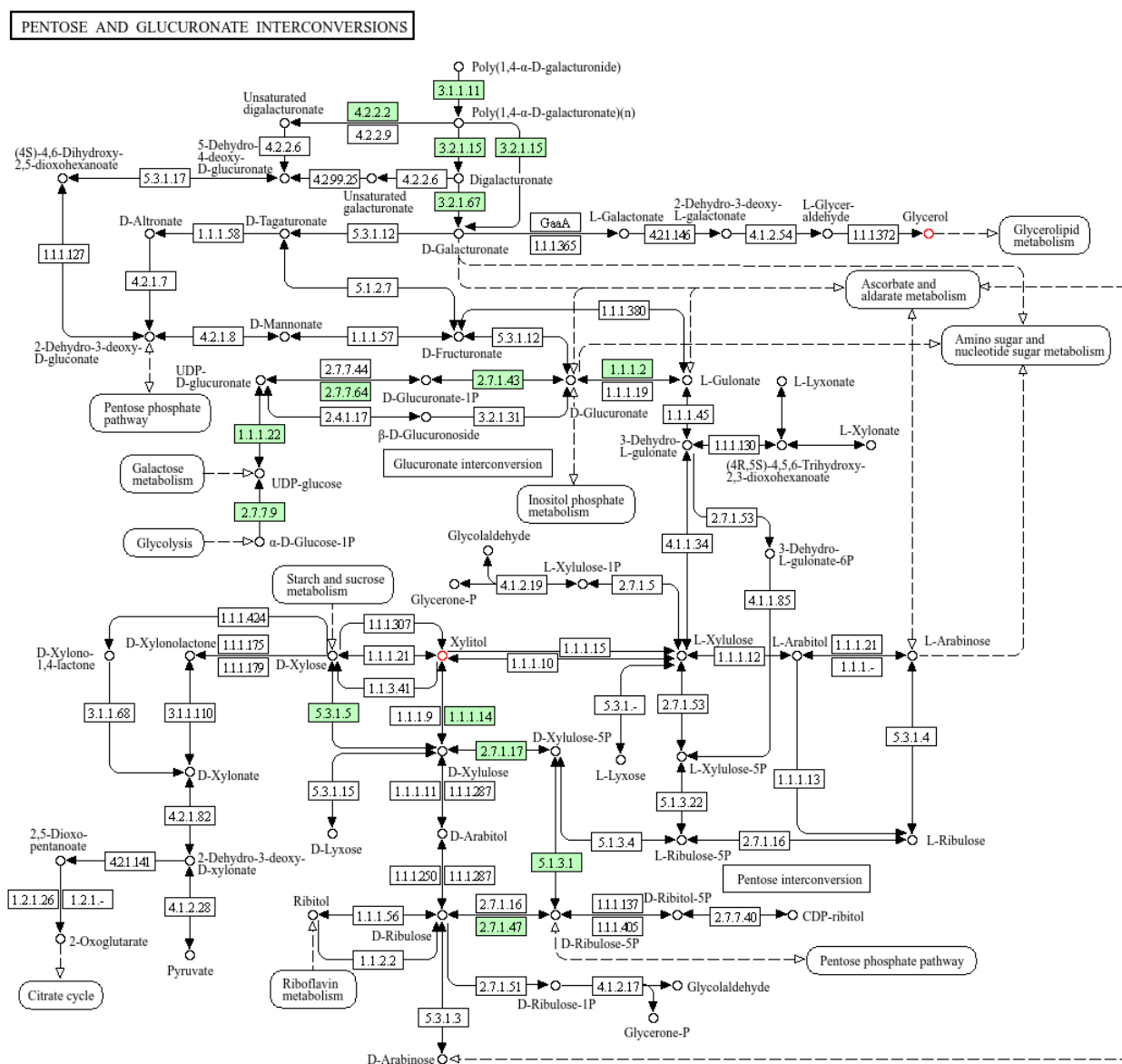
Esse aumento de desempenho pode estar relacionado às alterações do metabolismo, considerando o acúmulo de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e açúcares álcoois visto nos eventos transformados *CsVTC4*. Esses metabólitos reforçam a capacidade de osmoproteção, atuam como antioxidantes e diminuem o dano celular causado em situações de estresse devido ao aumento de ROS nas plantas (Khan *et al.*, 2020).

Através da análise metabólica das plântulas *CsVTC4* foi possível notar que a severidade do estresse aplicado determinou a diferenciação do metabolismo das plântulas selvagens e transgênicas. Isso porque somente nas condições de estresse mais severo (90 mM e 150 mM de NaCl) foi possível notar um distanciamento do perfil metabólico das plantas transgênicas do perfil metabólico da linhagem selvagem através da análise de PCA.

Mesmo o gene inserido tendo como função principal a conversão de mio-inositol e de ácido ascórbico, nem todos os eventos transgênicos mostraram um aumento da quantidade de MI ou do ácido ascórbico quando comparados à linhagem selvagem, apesar disso, foi possível encontrar o acúmulo de alguns derivados do MI como o galactinol e a rafinose, ou de outros intermediários que estão ligados a via que foi alterada, como, por exemplo: sorbitol, manitol, ácido glucônico, xilitol, glicerol e galactose, cujas vias são explicitadas abaixo.

O ácido glucônico é formado a partir da reação do mio-inositol com o oxigênio, através da ação da enzima MIOX. O ácido glucônico pode ser desviado para a via de interconversões de glucoronato e pentose (figura 37). Nesta via pode ocorrer a conversão do ácido glucônico em xilitol ou glicerol, que são polióis.

O xilitol e o glicerol são compostos osmorreguladores que auxiliam a planta a manter o potencial hídrico celular em um patamar ideal. A aplicação exógena de xilitol mostrou amenizar os efeitos do estresse hídrico em várias espécies, como tomate, pimenta e pepino (Shin *et al.*, 1995). O glicerol também pode participar na estabilização de proteínas e membranas durante o estresse oxidativo gerado por condições adversas como, por exemplo, o estresse osmótico (Eastmond, 2004).

Figura 37 – Via do metabolismo de interconversão de glucoronato e pentose em *Setaria viridis*

Fonte: (Kegg, 2024).

Os compostos xilitol e glicerol estão destacados em vermelho.

O mio-inositol também é um precursor essencial na síntese de galactinol. A reação é catalisada pela enzima galactinol sintase (Gals), que adiciona um resíduo de galactose ao mio-inositol, formando o galactinol. O galactinol atua como um doador de galactose na síntese de rafinose. Ele também tem funções na proteção celular contra estresses ambientais, como a seca e a salinidade, ajudando na estabilização de membranas celulares e proteínas, além de atuar como *scavenger* de ROS (Nishizawa *et al.*, 2008b).

O manitol, o sorbitol e a GDP-deoxi-D-talose estão destacados em vermelho. A alfa-d-glicose está destacada em rosa.

A talose, um açúcar raro de interesse comercial, foi acumulada na maioria dos eventos durante o estresse salino em plantas e também em plântulas nos tratamentos com 30 e 150 mm de NaCl.

A talose apresenta diversas aplicações econômicas promissoras, mas a sua produção em larga escala ainda é um desafio. Na indústria farmacêutica, a talose e seus derivados têm demonstrado potencial em várias áreas terapêuticas. Esse açúcar é um componente de compostos bioativos com atividade antitumoral, antimicrobiana e imunossupressora. Derivados da talose são relevantes na produção de fármacos para combater o câncer. Na indústria alimentícia, a talose tem

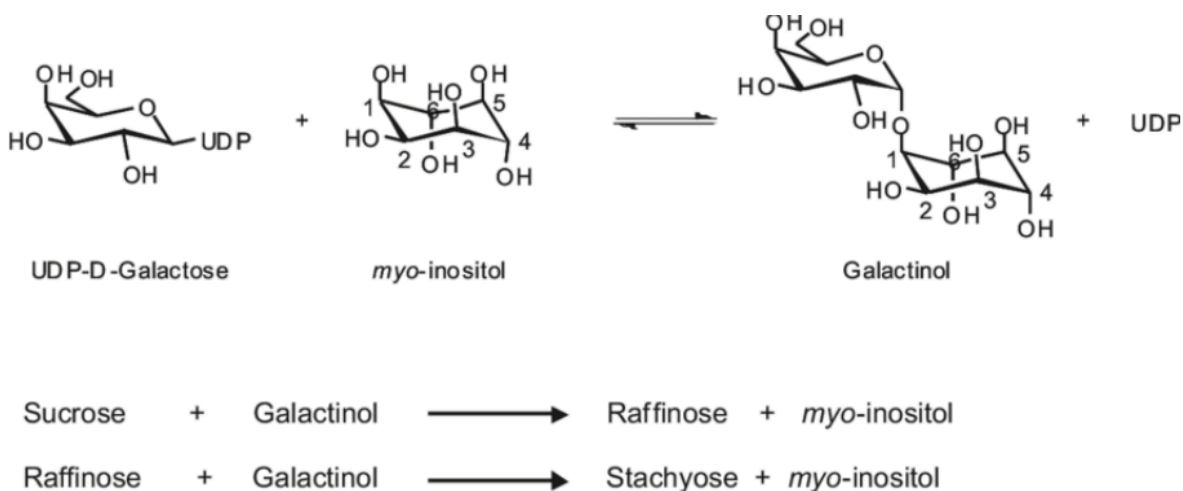
potencial como adoçante de baixa caloria. Existem estudos para produção de talose via rota biotecnologia utilizando microorganismos (Bilal *et al.*, 2018 e Xiao *et al.*, 2010 e Chen *et al.*, 2016).

O manitol é um poliol que se acumula em altas concentrações no citoplasma, ajudando a manter o equilíbrio osmótico e a evitar a desidratação celular durante o estresse osmótico, além de atuar como eliminador de radicais livres, protegendo as estruturas celulares dos danos oxidativos. Estudos mostraram que a biossíntese de manitol direcionada aos cloroplastos aumentou a eficiência fotossintética e reduziu a suscetibilidade ao estresse oxidativo (Stoop *et al.*, 1996). A introdução de genes envolvidos na biossíntese de manitol em plantas que não o produzem naturalmente aumentou a tolerância vegetal contra estresses abióticos. Por exemplo, plantas de tabaco transgênicas expressando o gene da manitol-1-fosfato desidrogenase apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo, salino e hídrico (Wani *et al.*, 2021).

O sorbitol também desempenha um papel significativo na proteção contra estresse abiótico, particularmente no estresse salino e hídrico. Essa molécula atua como um osmoprotetor, contribuindo para o ajuste osmótico e também pode proteger proteínas da desnaturação causada pelo estresse, garantindo sua funcionalidade em condições adversas. Além disso, pode auxiliar na estabilização da membrana celular, preservando sua integridade e fluidez. A introdução do gene da sorbitol-6-fosfato desidrogenase em plantas de tabaco resultou em níveis aumentados de sorbitol e maior tolerância ao estresse salino. É importante notar que, embora o acúmulo de sorbitol seja geralmente benéfico, concentrações excessivas podem levar a efeitos deletérios no crescimento das plantas. Portanto, o controle preciso dos níveis de sorbitol é crucial para maximizar sua eficácia na aclimação ao estresse, garantindo o desenvolvimento e a produtividade das plantas (Wani *et al.*, 2021).

Considerando a função destes compostos, notou-se que na análise de PLS-DA contendo todos os tratamentos aplicados em plântulas os compostos mais importantes que se acumularam nas condições de estresse severo (90 e 150 mM de NaCl) foram o galactinol, a rafinose e a prolina. O galactinol e a rafinose estão ligados a via do mio-inositol (figura 40) e a importância desses compostos na aclimação vegetal frente a diferentes estresses já foi discutida, já a prolina é um aminoácido notório na aclimação contra o estresse osmótico.

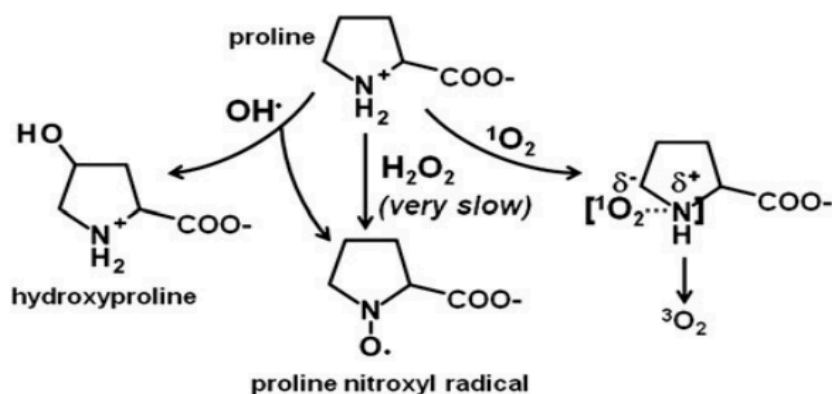
Figura 40 - Síntese de galactinol e rafinose a partir de mio-inositol



Fonte: (Bock *et al.*, 2009).

A prolina atua como um osmólito se acumulando em altas concentrações no citoplasma, prevenindo a perda de água e mantendo a turgidez celular. Esse aminoácido também tem capacidade de estabilizar proteínas e membranas sob condições de estresse, prevenindo a desnaturação e a agregação proteica e ajudando a preservar a atividade de enzimas sob condições adversas. Além disso, tem atividade de eliminação de ROS, protegendo as células dos danos oxidativos (figura 41). A prolina pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e peroxidase, reforçando ainda mais o sistema de defesa antioxidante da planta (Liang *et al.*, 2013; Iqbal *et al.*, 2015). Também atua como uma molécula sinalizadora, ativando vias de sinalização que levam à expressão de genes relacionados ao estresse e à produção de outras moléculas protetoras (Ghosh *et al.*, 2022).

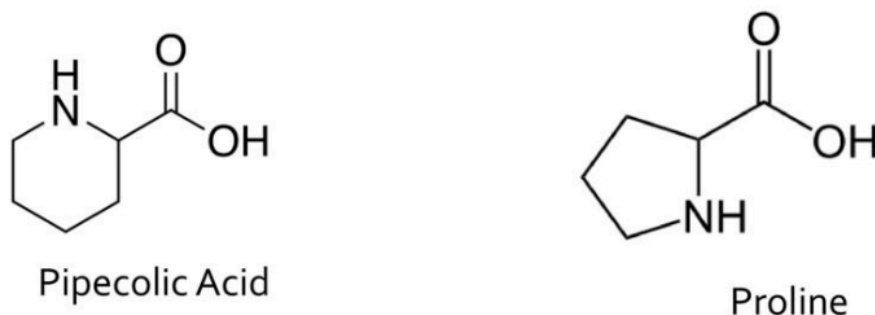
Figura 41 - Potenciais mecanismos de reação da prolina com ROS



Fonte: (Liang *et al.*, 2013).

Também é possível notar que o ácido pipecólico está fortemente relacionado com o tratamento de 150mM de NaCl em plântulas e é o principal metabólito identificado na PLS-DA que separa os eventos 3, 4 e 5 nessa condição de estresse, além disso está acumulado em grande parte dos eventos transgênicos em plantas sob condição de estresse salino. Esse metabólito desempenha um papel importante na resposta ao estresse osmótico em plantas. Em resposta a este estresse, o catabolismo da lisina leva à produção de ácido pipecólico. É importante notar que o ácido pipecólico é o homólogo da prolina (Moulin, *et al.*, 2006) (Figura 42).

Figura 42 - Estrutura química da prolina e do ácido pipecólico



O acúmulo da rafinose e do galactinol, quando comparado à plântula selvagem, foi notável nas condições de estresse de 30, 90 e 150 mM, mas não foi encontrado aumento de galactinol ou rafinose na condição controle.

Nas plântulas cultivadas na condição de estresse mais severo, em meio suplementado com 150 mM de NaCl nota-se um aumento do galactinol e do

mio-inositol em todos os eventos, já a rafinose não foi acumulada em nenhum dos eventos nesse tratamento. A reação entre galactinol e a sacarose forma rafinose e mio-inositol através da ação da enzima rafinose sintase. O acúmulo de galactinol e MI indica que a rafinose não está sendo formada por esta via, por isso o nível deste metabólito não foi maior em nenhum evento.

Já em plantas transgênicas, apesar de haver um aumento de galactinol ou rafinose na maior parte dos eventos *CsVTC4* que passaram por estresse salino ou após recuperação do estresse hídrico, também há acúmulo desses compostos na condição de controle, contudo nenhum evento mostrou aumento desses dois compostos durante o estresse hídrico. Apesar disso, todos os eventos transgênicos no tratamento de estresse hídrico acumularam xilitol e galactose.

Durante o estresse salino em plantas também houve acúmulo de manitol e galactose em todos os eventos transgênicos quando comparados à linhagem selvagem.

O ácido glucônico e o manitol foram acumulados tanto em plantas quanto em plântulas na maior parte dos eventos nas condições de controle, ou condições de estresse mais brandas como a reidratação ou a germinação em 30 mM de NaCl. Durante a aplicação de estresses severos a modulação metabólica não convergia para o acúmulo de ácido glucônico, mas isso ocorria nas condições controle ou de estresse mais branda, indicando que a inserção do gene leva à produção desse metabólito, mas que em condições de estresse o metabolismo pode ser desviado para a produção de outros compostos que possuem uma ação mais robusta na aclimação contra o estresse osmótico imposto.

Isso indica que a inserção do gene *CsVTC4* da via da biossíntese do MI não necessariamente levará ao acúmulo de MI, pois este pode ser desviado e utilizado para produção de outros metabólitos.

Por ser inserido em um promotor constitutivo, ou seja, expresso em todas as fases do ciclo de vida da planta e em todos os órgãos, é esperado que haja uma mudança no metabolismo mesmo nas condições controle, o que foi notado através do acúmulo do ácido glucônico e do manitol.

Outro composto aumentando em diversos tratamentos e ventos foi a serotonina, conhecida principalmente por seu papel como neurotransmissor em animais, também está envolvida no desenvolvimento das plantas. Pesquisas indicam que a serotonina pode influenciar o crescimento radicular, afetando processos como

divisão celular e alongação das raízes. Além disso, ela pode interagir com hormônios vegetais, como as auxinas, modulando o desenvolvimento do sistema radicular e auxiliando na adaptação das plantas a diferentes condições ambientais (Pelagio-Flores, *et al.*, 2011). O acúmulo da serotonina nas linhagens transgênicas pode explicar o melhor desempenho das linhagens de *S. Viridis CsVTC4* quando comparadas à linhagem selvagem em condições de estresse.

Apesar de ter sido encontrado maior quantidade de polióis totais através do ensaio colorimétrico em plântulas superexpressando *CsVTC4* não foi possível observar o mesmo efeito nas plantas transgênicas, cujos níveis de polióis não se diferenciam dos níveis da WT.

Possivelmente tal resultado foi encontrado devido a bifuncionalidade da enzima VTC4 e do papel do ácido ascórbico e do mio-inositol nos diferentes estágios de desenvolvimento vegetal.

Sabe-se que o mio-inositol é essencial nos estágios iniciais da germinação, desempenhando um papel vital na formação de polissacarídeos da parede celular e fosfolipídios da membrana celular, além de auxiliar na demanda energética para crescimento das plântulas, agindo como reserva de fosfato e na regulação osmótica (Sasaki; Taylor, 1986; Abid *et al.*, 2009). Em contraste, o ácido ascórbico em altas concentrações pode prejudicar a germinação, pois impede a degradação do endosperma e inibe a produção de ácido giberélico (GA), apesar de ser necessário em menores concentrações para a produção de GA (Ye *et al.*, 2012; Ishibashi; Iwaya-Inoue, 2006). Essa hipótese é corroborada pelo fato do ácido ascórbico não ter sido identificado na análise metabólica em nenhum tratamento em plântulas, contudo foi encontrado em alguns eventos de plantas adultas.

Assim, a produção de mio-inositol pode ter prevalecido nas plântulas superexpressando o gene *CsVTC4* e em plantas a rota do ácido ascórbico foi favorecida, já que esse composto é o principal antioxidante vegetal, desempenhando um papel crucial na manutenção do estado redox celular e na proteção da função fotossintética, que se intensifica com o amadurecimento da planta (Gallie, 2013).

Quanto às trocas gasosas, as plantas transgênicas de *Setaria viridis* superexpressando o gene *CsVTC4* apresentam melhoria nos parâmetros analisados em comparação com o tipo selvagem. Sob estresse hídrico, as plantas transgênicas são capazes de manter uma taxa fotossintética em níveis melhores do que o tipo selvagem.

Apesar disso, a assimilação de carbono durante o estresse hídrico foi negativa em todos os eventos, indicando que a taxa de consumo de CO₂ pelos processos fotossintéticos era menor do que a liberação de CO₂ gerado pela respiração celular (Peltier; Ibáñez, 2015). Inicialmente em condições de estresse osmótico os estômatos da planta fecham para evitar a perda de vapor de água para o ambiente, impedindo também as trocas gasosas do ambiente com a planta, apesar disso as plantas C4 possuem o metabolismo sintético adaptado para concentrar CO₂ nas células da bainha de feixe, onde o carbono é assimilado pela enzima RubisCo, mesmo com os estômatos fechados, contudo com a progressão do estresse hídrico outros fatores não estomáticos afetam diretamente a fotossíntese, como, por exemplo, redução da atividade da enzima RubisCo e menor assimilação de nitrato, levando à redução do conteúdo de clorofila e menor síntese de proteínas (Ghannoum, 2009), esses outros fatores não estomáticos podem explicar a assimilação negativa encontrada nesse tratamento.

Na reidratação, as plantas transgênicas são capazes de retomar mais rapidamente os parâmetros de troca gasosa, demonstrando uma capacidade de recuperação após o período de suspensão de água. O melhor desempenho dessas plantas pode estar relacionado à melhoria dos níveis de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares (Khan *et al.*, 2020).

O aumento desses metabólitos, causados pela superexpressão de *CsVTC4*, reduz os danos celulares e fornece alternativas para lidar com as condições de cultivo desafiadoras.

Os açúcares solúveis são essenciais para o ajuste osmótico e atuam na regulação da expressão de genes envolvidos na fotossíntese, na síntese de osmólitos e no metabolismo da sacarose. O aumento de aminoácidos contribui para a remoção de ROS, regulação do pH e ajuste osmótico e os ácidos orgânicos têm sido associados ao aumento da resposta das plantas ao estresse prolongado da seca. Eles desempenham um papel na regulação do metabolismo energético, na proteção contra danos oxidativos e na manutenção da homeostase celular (Khan *et al.*, 2020).

O maior desempenho nas trocas gasosas das plantas *CsVTC4* pode ser explicado pela ação do mio-inositol no aparato fotossintético. Estudos com diferentes espécies mostram que em condições de estresse a aplicação de mio-inositol ou a superexpressão de genes da via do mio-inositol promovem um aumento na

quantidade de clorofila e também da atividade fotossintética (Li *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2023; Sharma *et al.*, 2020).

Ademais, os fosfoinosítídeos derivados do mio-inositol promovem abertura estomática (Munnik; Vermeer, 2010), o que leva a aumento das trocas gasosas e consequentemente da entrada de CO₂ nas células. Isso pode explicar a maior condutância estomática observada nas plantas transformadas com o gene da CsVTC4 em condições de estresse salino e de reidratação após estresse hídrico.

Valores negativos de condutância estomática foram encontrados no tratamento salino e em alguns eventos do tratamento de reidratação após o estresse hídrico. Esses valores não condizem com a realidade e provavelmente foram encontrados devido a erros de calibração do IRGA utilizado, como, por exemplo, a calibração de água, problemas com a válvula do equipamento, ou também os reagentes utilizados deveriam ter sido trocados (Licor). Como o IRGA é um equipamento bastante sensível e realiza as medidas baseado nas referências de umidade e CO₂, configuradas previamente, qualquer erro de configuração e calibração irá repercutir nos resultados.

Apesar do aumento da assimilação de carbono observado nas plantas CsVTC4 não houve um acúmulo de biomassa da parte aérea em plantas cultivadas em solo. Isso pode ser explicado pelo fato de que durante estresses osmóticos as plantas tendem a dar preferência para o desenvolvimento de suas raízes e não da sua parte aérea. Sob estresse hídrico, a expansão foliar é reduzida para priorizar o crescimento das raízes e garantir o desenvolvimento, melhorando a captação de recursos hídricos e nutrientes. O crescimento radicular é sensível ao *status* hídrico do solo, com as raízes buscando zonas úmidas para continuar seu crescimento (Taiz *et al.*, 2021).

A ausência do acúmulo de biomassa no cultivo em solo também pode ser explicada pelas alterações metabólicas, pois a principal via de biossíntese do mio-inositol utiliza a glicose-6-fosfato e após formado o mio-inositol, esse composto pode ser utilizado para a produção de diversos metabólitos que não são estruturais, como galactinol, pinitol, ononitol, fosfatidilinositóis (Loweus *et al.*, 2000). Isso pode afetar a biossíntese de compostos estruturais, pois competem pelo mesmo substrato, principalmente em condições de estresse, onde há limitação de fotossintatos e onde o metabolismo é desviado para a produção de compostos que auxiliam na resposta de aclimação, como osmólitos e antioxidantes (Dumschott *et*

al., 2017).

Desta maneira, a alteração da alocação de carbono causada pela inserção do gene não promoveu aumento de biomassa, mas sim acúmulo de osmoprotetores, aminoácidos e ácidos orgânicos, o que favorece a fotossíntese, mas não se refletiu em aumento do crescimento vegetal.

O acúmulo de açúcares alcoóis, como o mio-inositol, pode ter tanto efeito deletério, quando um efeito positivo no crescimento e aumento de biomassa das plantas, isso porque ajuda na aclimação com o estresse, mas também compete pelos recursos energéticos e carbono disponível para sua síntese. Portanto, ainda é necessário aprofundar os estudos para compreender completamente os efeitos do aumento de polióis no rendimento das colheitas, pois podem resultar em resultados positivos ou negativos (Dumschott *et al.*, 2017).

Apesar de não mostrar aumento de biomassa, as plantas transgênicas foram mais resilientes frente às condições de estresse, isso pode levar a sua utilização em outras áreas como a fitorremediação de solos salinos.

Plantas tolerantes à salinidade são usadas para fitorremediação de solos, esse tipo de tratamento é mais barato quando comparado à remediação através de métodos químicos e traz resultados bastante promissores com um custo relativamente baixo. O uso de espécies que possuam interesse econômico tornam esse tipo de abordagem ainda mais viável (Arora, 2017). As plantas C4 superexpressando o gene *CsVTC4* poderiam ser utilizadas a fim de remediar o solo e posteriormente sua biomassa pode ser utilizada para a produção energética, o que torna sua aplicação interessante do ponto de vista econômico.

Apesar da limitação, de acúmulo de biomassa a estratégia da superexpressão da *VTC4* em plantas C4 pode trazer benefícios econômicos para os agricultores, reduzindo os custos com irrigação e defensivos agrícolas, uma vez que plantas mais tolerantes ao estresse demandam menor uso de água e são mais resilientes a condições adversas. Para contornar a falta de acúmulo de biomassa, uma abordagem viável seria a utilização de bioestimulantes específicos que promovem o crescimento vegetal, otimizando o balanço metabólico entre defesa e desenvolvimento estrutural. Dessa forma, a combinação de plantas geneticamente modificadas com práticas agrícolas inovadoras pode maximizar a produtividade em ambientes desafiadores, garantindo sustentabilidade e eficiência econômica.

7. CONCLUSÃO

Os resultados analisados indicam que a superexpressão do gene *CsVTC4* gera plântulas de *Setaria viridis* com maior tolerância ao estresse salino. Essas plântulas apresentaram melhora nos parâmetros de germinação, acúmulo de biomassa e crescimento radicular quando submetidas ao estresse.

Em plantas transgênicas, a superexpressão do gene *CsVTC4* auxiliou na manutenção dos parâmetros de trocas gasosas, favorecendo os processos de fotossíntese, porém, isso não foi o suficiente para gerar acúmulo de biomassa.

Mesmo sem o acúmulo de biomassa, as plantas transgênicas superexpressando o gene *CsVTC4* podem ser aplicadas na agricultura para recuperação de solos degradados, caso seja confirmado que essas plantas possam remover o sal do solo e não somente sejam capazes de crescer em ambiente salino, sendo assim utilizadas na fitorremediação de solos salinos.

Essa hipótese foi levantada, pois as plantas transformadas mostraram taxas fotossintéticas mais altas durante o estresse salino e maior crescimento radicular de plântulas durante o cultivo em meio suplementado com NaCl. Isso indica que essa linhagem pode auxiliar na expansão das terras agricultáveis sem que seja necessário realizar mudança do uso da terra, evitando o desmatamento.

Além disso, durante o estresse salino as plantas transformadas mostraram um acúmulo de talose, que é um composto com aplicação comercial na indústria farmacêutica e alimentícia. Caso seja possível extrair esse composto da biomassa obtida, a aplicação da linhagem de *S. viridis* na agricultura se torna ainda mais viável economicamente, já que seria possível extrair um composto de alto valor agregado.

Sendo assim, a inserção de genes da via do mio-inositol, mostra um bom potencial para a criação de linhagens de plantas C4 tolerantes a estresses osmóticos, voltadas para a produção energética, contudo ainda são necessários mais testes para compreender como evitar que características indesejadas como menor acúmulo de biomassa se manifestem no fenótipo das plantas transformadas.

Diversos resultados indicam que essa linha de pesquisa pode ser promissora, lembrando que a aclimação e o desenvolvimento vegetal em condições de estresse são traços multigênicos e, portanto, a alteração de um único gene pode não ser suficiente para obter respostas robustas de acúmulo de biomassa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, G. *et al.* Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. **Gene**, v. 439, n. 1-2, p. 1-10, 2009.
- ARORA, S.; SINGH, A. K.; SAHNI, D. **Bioremediation of salt-affected soils: challenges and opportunities**. Bioremediation of salt affected soils: an Indian perspective, p. 275-301, 2017.
- BENEVENUTO, R. F. *et al.* Alterations in genetically modified crops assessed by omics studies: Systematic review and meta-analysis. **Trends in Food Science & Technology**, 2022.
- BENNETZEN, J. L. *et al.* Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 555-561, 2012.
- BILAL, M. *et al.* Metabolic engineering pathways for rare sugars biosynthesis, physiological functionalities, and applications—a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 16, p. 2768-2778, 2018.
- BOEHM, C.; BOCK, R. Recent Advances and Current Challenges in Synthetic Biology of the Plastid Genetic System and Metabolism. **Plant Physiology**, v. 179, n. 3, p. 794-802, 2019.
- BOCK, C.; RAY, H.; GEORGES, F. Down-regulation of galactinol synthesis in oilseed *Brassica napus* leads to significant reduction of antinutritional oligosaccharides. **Botany**, v. 87, n. 6, p. 597-603, 2009.
- BRUTNELL, T. 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.
- CHEN, Z. *et al.* Advances in the enzymatic production of L-hexoses. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 6971-6979, 2016.
- CHRISTOU, Paul *et al.* Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 19, p. 7500-7504, 1989.
- 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.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasil deve atingir recorde na produção de açúcar mesmo com redução na produção de

cana-de-açúcar na safra 2024/2025. **Últimas notícias**, 2025a. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5501-brasil-deve-atingir-recorde-na-producao-de-acucar-mesmo-com-reducao-na-producao-de-cana-de-acucar-na-safra-2024-2025>> Acesso em: 18 jan. 2025.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Produção de cana-de-açúcar na safra 2023/24 chega a 713,2 milhões de toneladas, a maior da série histórica. **Últimas notícias**, 2024b. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5489-producao-de-cana-de-acucar-na-safra-2023-24-chega-a-713-2-milhoes-de-toneladas-a-maior-da-serie-historica>> Acesso em: 18 jan. 2025.

CUNHA, A. P. MA. *et al.* Extreme drought events over Brazil from 2011 to 2019. **Atmosphere**, v. 10, n. 11, p. 642, 2019.

GAZZONI, D. L. **Balanco de emissões de CO₂ por biocombustíveis no Brasil: histórico e perspectivas**. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

GEIRINHAS, J. L. *et al.* Recent increasing frequency of compound summer drought and heatwaves in Southeast Brazil. **Environmental Research Letters**, v. 16, n. 3, p. 034036, 2021.

DATTA, A. Genetic engineering for improving quality and productivity of crops. **Agriculture & Food Security**, v. 2, p. 15, 2013.

DIAS, H.F.; SENTELHAS, P. C. Dimensioning the impact of irrigation on sugarcane yield in Brazil. **Sugar Tech**, v. 21, p. 29-37, 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, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUMSCHOTT, K. *et al.* Post photosynthetic carbon partitioning to sugar alcohols and consequences for plant growth. **Phytochemistry**, v. 144, p. 243-252, 2017.

EASTMOND, P. J. Glycerol-insensitive Arabidopsis mutants: gli1 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. **The Plant Journal**, v. 37, n. 4, p. 617-625, 2004.

EPE - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanco Energético Nacional 2023**. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2023>> Acesso em: 20 jan. 2025.

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

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The impact of disasters and crises on Agriculture and Food Security**: 2021. Italy, 2021.

FARGIONE, J. *et al.* Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1235-1238, 2008.

FOYER, C. H. *et al.* Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 455-484, 2009.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 635-644, 2009.

GALLIE, D. R. L-Ascorbic acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. **Scientifica**, v. 2013, n. 1, p. 795964, 2013.

GHOSH, U. K. *et al.* Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. **Plant Biology**, v. 24, n. 2, p. 227-239, 2022.

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

GUHA-SAPIR, D. *et al.* (Ed.). **The economic impacts of natural disasters**. Oxford University Press, 2013.

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.

HU, L. *et al.* Overexpression of MdMIPS1 enhances drought tolerance and water-use efficiency in apple. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 21, n. 7, p. 1968-1981, 2022.

IEA - International Energy Agency. Renewables 2023, **Paris: IEA**, 2022. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/renewables-2023/transport-biofuels>> Acesso em: 20 jan. 2025.

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

IQBAL, N.; NAZAR, R.; KHAN, N. A. (Eds.). **Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies**. Springer, 2015.

ISHIBASHI, Y.i; IWAYA-INOUE, M. Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. **Plant production science**, v. 9, n. 2, p. 172-175, 2006.

JIA, Q. *et al.* The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 16, p. 3999, 2019.

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.

KEGG. KEGG Pathway Search. Disponível em: https://www.kegg.jp/kegg-bin/search_pathway_text?map=svs&keyword=&mode=1&viewImage=true. Acesso em: 2024.

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

KHAN, N. *et al.* Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. **Pak. J. Bot.**, v. 52, n. 2, p. 355-363, 2020.

KHURANA, N.; CHAUHAN, H.; 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.

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.

LIANG, X. *et al.* Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 9, p. 998-1011, 2013.

LICOR Biosciences. Unreasonable Results. Disponível em: <https://www.licor.com/env/support/LI-6400/topics/troubleshooting-results.html#ImpossibleCis>. Acesso em: 10 jan. 2025.

LISKO, K.A. *et al.* Elevating vitamin C content via overexpression of myo-inositol oxygenase and L-gulonolactone oxidase in *Arabidopsis* leads to enhanced biomass and tolerance to abiotic stresses. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, p. 643-655, 2013.

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.; 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.

MOULIN, M. *et al.* The lysine-ketoglutarate reductase–saccharopine dehydrogenase is involved in the osmo-induced synthesis of pipercolic acid in rapeseed leaf tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 7-9, p. 474-482, 2006.

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.

MUNNIK, T.; VERMEER, J. EM. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 4, p. 655-669, 2010.

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.

NISA, Z. *et al.* Constitutive overexpression of myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GsMIPS2) from Glycine soja confers enhanced salt tolerance at various growth stages in *Arabidopsis*. **Journal of Northeast Agricultural University** (English Edition), v. 23, n. 2, p. 28-44, 2016.

NISHIZAWA-YOKOI A; YABUTA, Y.; 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, 2008a.

NISHIZAWA-YOKOI A; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant physiology**, v. 147, n. 3, p. 1251-1263, 2008b.

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

PELAGIO-FLORES, Ramón et al. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 3, p. 490-508, 2011.

PELTIER, D. M. P; IBÁÑEZ, I. Patterns and variability in seedling carbon assimilation: implications for tree recruitment under climate change. **Tree Physiology**, v. 35, n. 1, p. 71-85, 2015.

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.

RATTIS, L. et al. Climatic limit for agriculture in Brazil. **Nature Climate Change**, v. 11, n. 12, p. 1098-1104, 2021.

REYES, J. A. O. et al. Drought impact on sugarcane production. **Agricultural research updates**, v. 35, 2021.

RFA - Renewable Fuels Association. Annual Ethanol Production. 2024. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>> Acesso em: 17 jan. 2025.

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

SASAKI, K.; TAYLOR, I. E. P. myo-Inositol synthesis from [1-3H] glucose in *Phaseolus vulgaris* L. during early stages of germination. **Plant physiology**, v. 81, n. 2, p. 493-496, 1986.

SAXENA, S. C. et al. Differentially expressed myo-inositol monophosphatase gene (CaIMP) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad substrate specificity and improves seed germination and seedling growth under abiotic stresses. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 18, p. 5623-5639, 2013.

SENGUPTA, S. et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 656, 2015.

SHARMA, N.; CHAUDHARY, C.; KHURANA, P. Wheat Myo-inositol phosphate synthase influences plant growth and stress responses via ethylene mediated signaling. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10766, 2020.

SHARMA, N.; SHREE, B.; KHURANA, P.t. Myo-inositol phosphate synthase improves heat stress tolerance by ethylene-mediated modulation of chlorophyll content and photosynthetic efficiency. **Protoplasma**, v. 260, n. 4, p. 1097-1107, 2023.

SHIN, C. C.; FAVSTRITSKY, N. A.; SANDERS, B. M. Method of using sorbitol or xylitol for plant water loss reducing agent. **U.S. Patent**, n. 5459121, 1995.

SMIRNOFF, N. Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of botany**, v. 78, n. 6, p. 661-669, 1996.

SMIRNOFF, N.; 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.

STOOP, J. M. H; WILLIAMSON, J. D.; PHARR, D. M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 5, p. 139-144, 1996.

TAIZ, L. *et al.* **Fundamentos de fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

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 UNICA**, 2022. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/safra-2021-2022-processa-523-milhoes-de-toneladas-d-e-cana/>>. Acesso em: 17 jan. 2025.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Etanol reduz emissões no Brasil equivalente à soma de 5 países. **Notícias UNICA**, 2023. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/etanol-reduz-emissoes-no-brasil-equivalente-a-soma-d-e-5-paises/>>

VALLURU, R.; 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.

VÍLCHEZ, J. I. *et al.* DNA demethylases are required for myo-inositol-mediated mutualism between plants and beneficial rhizobacteria. **Nature plants**, v. 6, n. 8, p. 983-995, 2020.

WANG, L. *et al.* Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 571-582, 2014.

WANI, S.; GANGOLA, M. P.; RAMADOSS, B. R. (Eds.). **Compatible solutes engineering for crop plants facing climate change**. Springer International Publishing, 2021.

WEBER, A. P. M.; VON CAEMMERER, S. Plastid transport and metabolism of C3 and C4 plants—comparative analysis and possible biotechnological exploitation. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 3, p. 256-264, 2010.

XIAO, H. *et al.* Convenient Synthesis of D-Talose from D-Galactose. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 1229-1232, 2010.

YE, N. *et al.* Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 5, p. 1809-1822, 2012.

YOUSEF, E.; NASEF, I. Exogenous Application Effect of Indole 3-Butyric Acid and Myo-inositol on Improving Growth, Productivity and Bulb Quality of Garlic. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 48, n. 1, p. 111-122, 2021.

ZAFAR, S. A. *et al.* Engineering abiotic stress tolerance via CRISPR/Cas-mediated genome editing. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 470-479, 2020.

ZAMAN, M.; Shahid, S. A.; Heng, L., Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation using Nuclear and Related Techniques. **Springer Nature**, 2018.

ZHANG, L.; HE, X. Nitrogen utilization mechanism in C3 and C4 plants. **Chinese Bulletin of Botany**, v. 55, n. 2, p. 228, 2020.

APÉNDICE A**>D949 p6oAct-UbiZm-CsVTC4**

ATGGGCGCCACCGAGGGTCCCGGAGACAAGCCTATCGATAACGGCACTCGCGG
GATGGAGGACTACCTCAGGGTCGCTCTGCTCGCCGCGAAGCAGGCCGGCATTG
TGGATTTGGTCACCGAGACCGACAAGAAGTGCGAGGAGATCATCTTCTCCAGCA
TTCGTGACGCTTTCCCAGATCACAAGTTCATCGGGGAGGAGGACTCTGCAGCCC
AGGGCTTCACAGCTGATCTGACCGACAACCCGACCTGGATGGTGGACCCCGTT
GATGGAACCTACCAACTTCGTCCATCGCTTCCCTTTCTGTGTGCGTCTGCATCGGG
CTCGCCATAGACAAGAAAGTGGCCGTCGGCGTAGTGTACAATCCCATCCTTGAT
GAGCTGTACACGGCCATGAGGGGGTAAGGGCGCGTTCTCAACGGCCAGCCAAT
TAACGTCTCCGGATGCACCGACCTCGGTAGCGCCCTGATCATCACCGAGATCGG
GGTACTCGTGATGACGCCACCCTCGACGCTCTGTTCGGCCGGATTTCCGCAAT
CGTCAAGGGCGCCCGCAGCGTGCGTTGCATGGGTTCTGCGCTTTGGATATGT
GCTCGGTCGCCTGCGGCAGGGCCGAAGTGAGTTATGAAGTCGGATTCGGCGGT
CCGTGGGACGTGGCGGCTGCCTCCCTCATCGTCGAGGAGGCCGGTGGCCACG
TTGCTGATCCCGCCGGAGGCCCTTTCGACATTATGGGGCGCAGGGTGCTTGCA
GCTAGCAACGCCGGTCTGGTTCGAGCAGGTGGCGGCTCTCATCGCTCCCCTGCC
ACTCGGCCCCGAAGGAGCCTCAGCCCTCAGCCGTCAGCTAA