**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Natália Gonçalves Takahashi

**Caracterização de plantas de cana-de-açúcar e de cana
energia superexpressando o fator de transcrição
ShSHN1, visando aumento de produtividade e melhoria
da matéria-prima para produção de etanol 2G.**

**RIBEIRÃO PRETO
2021**

NATÁLIA GONÇALVES TAKAHASHI

**Caracterização de plantas de cana-de-açúcar e de cana
energia superexpressando o fator de transcrição
ShSHN1, visando aumento de produtividade e melhoria
da matéria-prima para produção de etanol 2G.**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para a
obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

**RIBEIRÃO PRETO
2021**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Takahashi, Natália Gonçalves

Caracterização de plantas de cana-de-açúcar e de cana energia superexpressando o fator de transcrição *ShSHN1*, visando aumento de produtividade e melhoria da matéria-prima para produção de etanol 2G. – Ribeirão Preto – 2021.

138 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: de Souza, Silvana Aparecida Creste Dias

1. Fator de Transcrição. 2. Biomassa. 3. Lignina. 4. Sacarificação. 5. Biocombustíveis.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: TAKAHASHI, Natália Gonçalves

Título: Caracterização de plantas de cana-de-açúcar e de cana energia superexpressando o fator de transcrição *ShSHN1*, visando aumento de produtividade e melhoria da matéria-prima para produção de etanol 2G.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

Apoio financeiro:

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos 2017/24420-0 e 2014/08468-4”

*Aos meus pais e irmão, com muito amor, admiração e
gratidão por todo apoio ao longo de minha jornada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP – Ribeirão Preto), pela oportunidade de realização do meu Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Ao Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, em Ribeirão Preto - SP, por toda a estrutura ofertada em meu trabalho.

À Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, por toda a paciência, zelo, orientação, broncas, conselhos e cuidados, muitas vezes de mãe, oferecidos a mim ao longo destes sete anos no Laboratório de Biotecnologia. Sempre ouvi falar que grande parte dos alunos tem problemas com orientadores durante a pós-graduação, e justamente por ela resolvi, apesar de tudo, tentar concluir a minha. A ela toda a minha gratidão.

Ao Dr. Michael dos Santos Brito, por mesmo a distância e sem muito tempo, conseguir me orientar em todos os momentos precisos. Por toda ajuda e suporte dados a mim durante esses sete anos que resolvi me aventurar no mestrado e doutorado. Obrigada pela confiança em me deixar continuar sua pesquisa e por todos os ensinamentos desde o dia um.

À Dra. Paula Macedo Nobile pela amizade e ensinamentos. Por toda a consultoria prestada desde o primeiro momento dos estudos com SHINE. Obrigada por ter acreditado neste fator de transcrição e dado suporte financeiro inicial com seu projeto FAPESP, processos 13/19214-0 e 14/09422-8, os quais resultaram em grande conhecimento sobre *ShSHN1* em arroz e que nos levou ao meu projeto de doutorado.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia, Larissa, Alexandre, Rafael, Maria Natália, Fernanda, Raquel, Juliana, Maicon, Thaís, Lúcia, Luis, Izadora, Marta, William, Daniel e Carneiro que de alguma forma colaboraram com a realização deste projeto.

Ao Mestre Paulo Henrique por toda ajuda que me foi dada no início do projeto.

À toda equipe Granbio, em especial ao Dr. José Antonio Bressiani e ao Mestre Hugo Soriano, por todo suporte e apoio com as canas energia e por todo auxílio durante em minha estadia em Maceió para coleta. Meu agradecimento também à Dra. Paula Macedo Nobile e sua equipe (Dra. Greice Lubini, Dr.

Rafael Fávero Peixoto Júnior, Carolina Veluci Brondi, Marina Carnaz Duarte Serra e Marcela Moreira) por todo esforço em transformar variedades de cana energia com *ShSHN1* e pelo auxílio quando preciso.

Aos demais pesquisadores e funcionários do Centro de Cana, por de alguma forma contribuírem com minha pesquisa.

Aos professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP – Ribeirão Preto), por todo conhecimento dividido durante as aulas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, que sempre estiveram lá por mim, me dando suporte nas horas que precisei e tiveram um papel importante na minha vida.

À minha família amada, tios, tias, primos e primas, por todo apoio, amizade e por se alegrarem e celebrarem minhas conquistas.

Ao meu irmão, Vitor Gonçalves Takahashi, por ser meu espelho, pelas dicas e conhecimento compartilhado. Obrigada por ser o melhor e mais orgulhoso irmão que eu poderia ter tido.

Aos meus pais, José Akira Takahashi e Lair Donizete Gonçalves Takahashi, por todo amor ofertado incondicionalmente, pela proteção, pelo apoio e broncas quando necessário. Agradeço por tudo que são e representam em minha vida, sem vocês eu nada seria.

Muito obrigada!

RESUMO

TAKAHASHI, N. G. **Caracterização de plantas de cana-de-açúcar e de cana energia superexpressando o fator de transcrição *ShSHN1*, visando aumento de produtividade e melhoria da matéria-prima para produção de etanol 2G. 2021.** Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O bioetanol da cana-de-açúcar apresenta-se como uma importante fonte alternativa na geração de energia quando comparado a combustíveis fósseis, principalmente por ser renovável, sustentável e eficiente. Na produção de etanol de segunda geração (E2G), a lignina, componente da biomassa lignocelulósica dificulta o acesso das enzimas ao substrato (celulose e hemicelulose) gerando baixos rendimentos de açúcares na hidrólise enzimática. Para contornar esse obstáculo, torna-se necessário modular a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de lignina, visando alterar sua quantidade e composição. O fator de transcrição (FT) SHINE tem se mostrado um candidato para manipulação genética, uma vez que este FT participa em diferentes rotas metabólicas. Em arroz, nosso grupo verificou que ele atua na via de biossíntese de lignina melhorando a eficiência do processo de sacarificação, além de promover maior acúmulo de biomassa. Com base nestes dados, este trabalho objetivou avaliar os efeitos causados pela superexpressão de *ShSHN1* em eventos de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 e 10 eventos elite de cana energia variedade Vx12-1744 superexpressando *ShSHN1*, com vistas aos parâmetros relacionados a composição de parede celular (PC): celulose, hemicelulose, lignina, pectina, além de sacarificação e razão S/G. Para cana-de-açúcar, os eventos transgênicos apresentaram um aumento no nível de expressão de *ShSHN1* de até 12 vezes maior comparado ao nível de expressão do gene endógeno. A avaliação dos eventos em vaso, em casa-de-vegetação, revelou aumento de até 310% de massa seca, 130% e 120% no número de perfilhos e gemas por vaso, respectivamente. Os resultados de componentes de PC nos tecidos folha, casca, miolo revelaram amplitude de variação entre os eventos obtidos, o que possivelmente reflete o local da inserção do transgene. A modificação desses parâmetros resultou na melhoria do processo de sacarificação de até 159% em casca e até 466% em miolo em eventos específicos. Para cana energia, a avaliação dos eventos transgênicos, em campo, revelou aumento de biomassa de até 231%. A avaliação dos componentes de PC e de sacarificação, conduzida em 10 eventos elite selecionados a campo, não evidenciou modificações significativas. Estes dados somados a uma maior expressão do gene endógeno em miolo, sugerem que o FT *ShSHN1* atua de forma tecido-específica em miolo, sendo este tecido muito mais

abundante em cana-de-açúcar do que cana energia. Diferentemente do observado na variedade tradicional SP80-3280, houve correlação entre o aumento de pectina e melhoria da sacarificação em cana energia (evento VxSHN215), corroborando com os dados obtidos anteriormente em arroz por nosso grupo. Análise da expressão de sete genes (C4H, C3H, HCT, 4CL, F5H, COMT, CAD) envolvidos na biossíntese de lignina foi conduzida em quatro eventos da cana-de-açúcar que apresentaram modificações nos componentes de PC e na sacarificação. Foram observadas alterações na expressão dos genes C4H, 4CL, F5H, HCT E COMT, os quais variaram para mais ou para menos nos eventos transgênicos em relação ao controle evidenciando que o FT SHN em cana atua modulando a expressão desses genes. Com base nos dados aqui obtidos foi possível comprovar a atuação do *SHN* como regulador mestre dos componentes de PC, evidenciando seu potencial biotecnológico para aumento de produtividade e modificação da biomassa lignocelulósica para produção de etanol 2G. Ainda, as diferenças observadas nos componentes de PC dos eventos transgênicos de cana-de-açúcar e de cana energia evidenciaram a necessidade de se fazer a prova de conceito da função de um gene na espécie de origem.

Palavras-chave: Fator de transcrição; Biomassa; Lignina; Sacarificação; Biocombustíveis.

ABSTRACT

TAKAHASHI, N. G. **Characterization of sugarcane and energy cane plants overexpressing *ShSHN1* transcription factor aiming increase in productivity and improvement of raw material for the production of 2G ethanol. 2021.** Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Sugarcane bioethanol is an important alternative source in energy generation when compared to fossil fuels, mainly because it is renewable, sustainable and efficient. In the production of second-generation ethanol (E2G), lignin, a component of lignocellulosic biomass, hinders the access of enzymes to the substrate (cellulose and hemicellulose) generating low sugar yields in the enzymatic hydrolysis. To overcome this obstacle, it is necessary to modulate the expression of genes involved in the lignin biosynthesis pathway, aiming to change its quantity and composition. The transcription factor (TFs) SHINE has been shown to be a candidate for Previous work conducted by our group verified that it acts in the lignin biosynthesis pathway, improving the efficiency of the saccharification process in rice, in addition to promoting greater biomass accumulation. Based on these data, this study aimed to evaluate the effects caused by overexpression of *ShSHN1* in events of sugarcane variety SP80-3280 and 10 elite events of sugarcane variety Vx12-1744 overexpressing *ShSHN1*, with a view to parameters related cell wall (CW) composition: cellulose, hemicellulose, lignin, pectin, in addition to saccharification and S/G ratio. For sugarcane, transgenic events showed an increase in the expression level of the *ShSHN1* gene of up to 12 times greater than the endogenous gene. The evaluation of events in pots, at greenhouse, revealed an increase of up to 310% in dry mass, 130% in the number of tillers and 120% in the number of buds per pot when compared to non-transformed plants. The results of CW in leaf, rind and pith tissues revealed a significant range of variation between the events obtained, varying up or down between the events, which possibly reflects the location of the transgene insertion. The modification of these parameters resulted in an improvement of the saccharification process of up to 159% in rind and up to 466% in pith in specific events. For energy cane, the evaluation of transgenic events, in the field, revealed an increase in biomass of up to 231%. The evaluation of the CW and saccharification components, conducted in 10 elite events selected in the field, did not show significant changes. These data, added to a greater expression of the endogenous gene in the pith, suggest that the FT *ShSHN1* acts in a tissue-specific way in the pith, this tissue being much more abundant in sugarcane than in energy cane.

Differently from what was observed with SP80-3280, there was a correlation between increased pectin and improved saccharification in energy cane (event VxSHN215), corroborating data previously obtained in rice by our group. Analysis of the expression of seven genes (C4H, C3H, HCT, 4CL, F5H, COMT, CAD) involved in lignin biosynthesis was conducted in four sugarcane events. Alterations in the expression of genes C4H, 4CL, F5H, HCT and COMT were observed, which varied up or down in transgenic events when compared to control, showing that SHN in sugarcane acts modulating the expression of these genes. Based on the data obtained here, it was possible to prove the role of *ShSHN1* as a master regulator of cell wall components, highlighting its biotechnological potential for increasing productivity and modification of lignocellulosic biomass for the production of 2G ethanol. Furthermore, the differences observed in the CW components of the sugarcane and energy cane transgenic events reinforced the need to carry out proof of concept of the function of a gene in the species of origin.

Keywords: Transcription factor; Biomass; Lignin; Saccharification; Biofuel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de trabalho desenvolvido durante a realização do projeto	33
Figura 2 – Sítios alvos das enzimas de restrição usadas na digestão dos vetores pDESTSHNA07 e vetor pJFNPTII. (a) Sequência do cassete de expressão de <i>ShSHN1</i> contido no vetor pDESTSHNA07 e sítios de restrição das enzimas <i>BamHI-HF</i> e <i>HindIII</i> . (b) Mapa do vetor pJFNPTII (ALTPETER et al., 2000) e sítios de restrição das enzimas <i>BamHI-HF</i> e <i>HindIII</i> . (c) Vetor de superexpressão de <i>ShSHN1</i> (pOESHN).....	35
Figura 3 - Transformação de <i>calli</i> embriogênicos e seleção de eventos transformados de cana variedade SP80-3280. A: <i>calli</i> embriogênicos transformados com cassete de expressão de <i>ShSHN1</i> ; B: crescimento das plantas transgênicas em meio seletivo contendo geneticina; C: Eventos transgênicos e plantas controle em fase de aclimação.	36
Figura 4 - Transformação de <i>calli</i> embriogênicos e seleção de eventos transformados de cana Vx12-1744 (Vertix 2). A: <i>calli</i> embriogênicos transformados com gene <i>ShSHN1</i> ; B: regeneração em meio seletivo contendo geneticina; C: Eventos transgênicos e plantas controle em fase de aclimação.	37
Figura 5 – Locais de medições biométricas em cana-de-açúcar. Comprimento do colmo desde o corte na base até a primeira lígula aparente, diâmetro do colmo medido na metade do mesmo, comprimento e diâmetro da folha +1 (com primeira lígula aparente) e número de folhas verdes. (modificado de Paes; Oliveira, 2005).....	40
Figura 6 – Materiais coletados para análise de celulose, hemicelulose, pectina, lignina, razão S/G e sacarificação.	41
Figura 7 - Dados genômicos de <i>ShSHN1</i> disponíveis no SUCEST – Fun. a. distribuição das sequências advindas do blast com a sequência de <i>ShSHN1</i> . b. Alinhamento da sequência de <i>ShSHN1</i> com a sequência do banco de dados. Em azul está demonstrado o local do íntron presente no gene.....	46
Figura 8 – Eletroforese em gel de 1% agarose dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> , para confirmação do cassete de expressão <i>ShSHN1</i> . Produtos de PCR com 636 pb amplificados com os <i>primers</i> SHN ATG KOZAC	

– Fw e SHN stop1 – Rv. M: marcador de 100pb, de 1 a 18 colônias transformadas; C-: controle negativo.	47
Figura 9 – Eletroforese em gel de 1% agarose dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> para detecção da presença do vetor pOESHN. Produtos de PCR com 636 pb amplificados com os <i>primers</i> SHN ATG KOZAC – Fw e SHN stop1 – Rv. 2 e 7: inserto de 636 pb amplificado. M: Marcador molecular 100pb; C: controle negativo.	47
Figura 10 – Eletroforese em gel de 1% agarose dos produtos de PCR de colônias de <i>Agrobacterium</i> transformadas com o vetor pOESHN. A presença do vetor foi confirmada para todas as colônias selecionadas. Produtos de PCR com 636 pb, evidenciados no losango branco, amplificados com os <i>primers</i> SHN ATG KOZAC – Fw e SHN stop1 – Rv. M: marcador molecular de 100pb.	48
Figura 11 – Cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, superexpressando <i>ShSHN1</i> e NT, em cultivo <i>in vitro</i>	49
Figura 12 – Plantas de cana-de-açúcar superexpressando <i>ShSHN1</i> (transgênicas) e NT (controles) com um mês de desenvolvimento, em fase de rustificação em casa de vegetação de alta umidade.	49
Figura 13 – Eventos de cana-de-açúcar transformados para superexpressão de <i>ShSHN1</i> . A: Plantas com quatro meses de desenvolvimento. B: Mapa da distribuição inteiramente ao acaso dos vasos de 5L em estufa. Em amarelo estão representadas plantas NT e em branco estão os eventos superexpressando <i>ShSHN1</i>	50
Figura 14 - Eventos de cana-de-açúcar transformados para superexpressão de <i>ShSHN1</i> em vasos de 50L. A: Eventos selecionados e controles aos 11 meses de desenvolvimento. B: Mapa da distribuição dos vasos de 50L em estufa. Em amarelo estão representadas plantas NT e em branco estão os eventos superexpressando <i>ShSHN1</i>	51
Figura 15 – Geração T ₁ de eventos selecionados de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, superexpressando <i>ShSHN1</i> , cultivados em vasos de 50L, em casa-de-vegetação.	52
Figura 16 – Aspecto fenotípico de plantas de cana-de-açúcar NT comparada ao evento T283A superexpressando o gene <i>ShSHN1</i>	53

Figura 17 – Perfil de expressão dos eventos transformados para superexpressão de <i>ShSHN1</i> e controles. NT representa a média dos controles e eventos iniciados com T indicam eventos superexpressando <i>ShSHN1</i>	54
Figura 18 – Perfil de expressão de <i>ShSHN1</i> nos 26 eventos transgênicos e 6 controles selecionados, aos 8 meses de idade, em folha +1. NT é a média dos controles e não possuem <i>ShSHN1</i> superexpresso e os demais eventos são positivos para a presença cassete de superexpressão <i>ShSHN1</i>	55
Figura 19 – Análise biométrica de canas-de-açúcar variedade SP80-3280 superexpressando <i>ShSHN1</i> , NT (não transformadas) e SP80-3280 que não passou por cultura de tecidos. A. Peso da touceira por vaso; B. Altura total do perfilho principal; C. Média do diâmetro de todos os perfilhos por vaso e D. Número de perfilhos por vaso.	58
Figura 20 - Análise de teor de lignina e razão S/G de plantas T ₀ da variedade SP80-3280 superexpressando <i>ShSHN1</i> , aos seis meses de idade. a. Teor de lignina determinada pelo método de brometo de acetila em folhas +3; b. Razão S/G em folhas +3 de cana-de-açúcar. Plantas não transformadas estão representadas em preto, eventos superexpressando <i>ShSHN1</i> estão representados em cinza.	60
Figura 21 - Análise de componentes da parede celular de plantas T ₁ da variedade SP80-3280 superexpressando <i>ShSHN1</i> , aos oito meses de idade. (a) Teor de lignina; (b) Razão S/G; (c) Conteúdo de pectina; (d) Conteúdo de hemicelulose; (e) Conteúdo de celulose; (f) Porcentagem de sacarificação. Plantas não transformadas estão representadas por barras vermelhas; em preto e cinza estão representados os resultados para casca e miolo, nos eventos transformados.	66
Figura 22 - Análise da Expressão de genes relacionados a síntese da parede celular em plantas da variedade SP80-3280 superexpressando <i>ShSHN1</i> . (a) <i>ShSHN1</i> ; (b) C3H; (c) C4H; (d) F5H; (e) HCT; (f) 4CL; (g) COMT e (h) CAD-A. Plantas NT estão representados por barras vermelhas, eventos superexpressando <i>ShSHN1</i> estão representados por barras cinzas. Asteriscos representam dados de expressão significativos.....	68
Figura 23 - Transformação de <i>calli</i> embriogênicos e seleção de eventos transformados de cana Vx12-1744 (Vertex 2). A: <i>calli</i> embriogênicos transformados com gene <i>ShSHN1</i> ; B: regeneração em meio seletivo contendo	

geneticina; C: Eventos transgênicos e plantas controle em fase de aclimação.	69
Figura 24 – Análise de expressão de 27 eventos transgênicos e 3 NT de cana energia variedade Vx12-1744 superexpressando <i>ShSHN1</i>	70
Figura 25 - Análises bioquímicas para a variedade Vx2 superexpressando <i>ShSHN1</i> . (a) Quantidade de Lignina, determinada pelo método de Brometo de Acetila, em porcentagem da parede celular; (b) Quantidade de Pectina em mg/g de parede celular; (c) Quantidade de Hemicelulose em mg/g de parede celular; (d) Quantidade de Celulose em mg/g de parede celular; (e) Porcentagem de sacarificação. Plantas NT estão representadas por barras vermelhas, eventos superexpressando <i>ShSHN1</i> estão representados em cinza.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados em PCR de confirmação da presença do gene .	34
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão de <i>ShSHN1</i> e dos genes relacionados à PC.....	39
Tabela 3 - Massa seca (quilograma/evento), número de perfilhos por evento em vaso e número de gemas por evento em vaso da variedade SP80-3280 superexpressando <i>ShSHN1</i>	57
Tabela 4 – Quantidade em nmol por 100 mg de material dos monômeros de lignina em canas-de-açúcar variedade SP80-3280 NT e superexpressando <i>ShSHN1</i>	62
Tabela 5 - Análises biométricas, em ciclo de cana soca, conduzidos a campo, de eventos transgênicos de cana energia superexpressando <i>ShSHN1</i>	72
Tabela 6 – Diferentes fenótipos apresentados em diferentes organismos e suas diferentes abordagens.....	78
Tabela 7 - Resumo das quantificações da parede celular com superexpressão de <i>ShSHN1</i> em cana-de-açúcar (SP80-3280) e cana energia (VX12-1744) ...	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AcBr – Brometo de Acetila

pb – Pares de Base

cDNA – DNA complementar

C_f – Concentração final

ChIP – Imunoprecipitação de Cromatina

DBD – Domínio de Ligação ao DNA

E2G – Etanol de Segunda Geração

EMSA - Electrophoretic mobility shift assay

ERF – Fatores Responsivos a Etileno

FT – Fator de Transcrição

FTs – Fatores de Transcrição

HOAc – Ácido acético

NaOH – Hidróxido de Sódio

NT – Não transformado

RNA-Seq – Sequenciamento Global de RNA

RRG – Redes Reguladoras de Genes

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pOESHN - vetor pJFNPTII contendo cassete para superexpressão de ShSHN1

SHN – *SHINE*

qPCR – PCR quantitativo

q.s.p. – quantidade suficiente para

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
1.1 A Importância do Etanol de Segunda Geração	23
1.2 Parede Celular Vegetal	25
1.3 Fatores de Transcrição, Parede Celular e Modificação da Biomassa	26
1.4 O Fator de Transcrição <i>SHINE</i>	28
1.5 Cana-de-açúcar e cana energia.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Obtenção de dados Genômicos de ShSHN1	33
3.2 Obtenção do Vetor e Transformação de <i>Agrobacterium</i>	33
3.3 Material Vegetal e Transformação Genética	36
3.4 Caracterização Molecular.....	37
3.4.1 Confirmação de Inserção do transgene	37
3.4.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise da expressão de <i>ShSHN1</i>	38
3.5 Avaliações Biométricas	39
3.6 Análises Bioquímicas e Sacarificação.....	40
3.6.1 Análise de Parede Celular – Pectina, Hemicelulose e Celulose ...	41
3.6.2 Porcentagem de Lignina – Brometo de Acetila.....	43
3.6.3 Razão S/G	44
3.7 Determinação da Porcentagem de Sacarificação	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Caracterização genômica de <i>ShSHN1</i>	45
4.2. Obtenção de vetor para superexpressão de ShSHN1 (pOESHN)	47
4.3. Cana-de-açúcar variedade SP80-3280	48

4.3.1 Plantas transgênicas variedade SP80-3280 superexpressando o fator de transcrição <i>ShSHN1</i>	48
4.3.2 Rustificação das mudas e Implementação dos experimentos	49
4.3.3 Plantio em vaso dos eventos selecionados	49
4.3.4 Caracterização molecular	53
4.3.5 Análises Biométricas.....	55
4.3.6 Análise de parede celular	58
4.3.7 Análise de expressão gênica de genes provavelmente relacionados a SHINE nas plantas <i>ShSHN1</i>	66
4.4 Cana energia variedade Vx12-1744.....	69
4.4.1 Transformação da Vx12-1744 com <i>ShSHN1</i>	69
4.4.2 Análises Biométricas nas plantas <i>ShSHN1</i>	70
4.4.3 Análise de parede celular em cana energia superexpressando <i>ShSHN1</i>	72
4.5 Perspectivas biotecnológicas para SHN	75
5. CONCLUSÕES	82
6. PERSPECTIVAS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	84
7. REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A: Manuscrito para submissão em revista científica da área	95
APÊNDICE B: Sequência Genômica de <i>ShSHN1</i> com regiões <i>downstream</i> e <i>upstream</i> do gene	132

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é uma fonte alternativa abundante para a produção de combustíveis (MCKENDRY, 2002; ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013). Os materiais lignocelulósicos são a biomassa da planta e compreendem os polímeros celulose, hemicelulose e lignina (BOTTCHEER et al., 2013). Dentre estes, a lignina possui a habilidade de resistir à degradação, sendo então considerada o principal gargalo para a produção de etanol lignocelulósico, por meio da conversão da celulose em açúcares fermentáveis, também conhecido como etanol de segunda geração (2G) (CHEN; DIXON, 2007; VANHOLME et al, 2010).

A lignina é originada através da polimerização de três monômeros, álcool sinapílico, álcool coniferílico e álcool p-cumarílico (CESARINO et al., 2012) que se polimerizam de diferentes maneiras podendo dar origem à diversas formas de lignina (AZADI et al., 2013). Após a polimerização, esses monômeros são chamados de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e unidades siringil (S) (CESARINO et al., 2012), e a quantidade dessas unidades (H, G e S) varia entre os tecidos, tipos de células e estágios de desenvolvimento na mesma planta (VANHOLME et al., 2010). A razão entre as unidades S e G é um parâmetro importante na caracterização da biomassa, (AGARWAL et al., 2019), uma vez que tecidos com maior quantidade de S possuem uma lignina menos condensada do que com maior quantidade de G, uma lignina com mais ligações (FERRER et al. 2008).

O manuseio eficiente da estrutura da lignina pode afetar positivamente a indústria de transformação de biomassa (AGARWAL et al., 2019). Chen & Dixon (2007) demonstraram que o silenciamento de genes que codificam enzimas que participam da via de biossíntese da lignina resultou na diminuição no conteúdo de lignina. Essa diminuição da lignina fez com que fosse liberados quase duas vezes mais açúcar no processo de sacarificação da parede celular (PC) em comparação com os não transformados (NT), de modo que a modificação da lignina poderia evitar a necessidade de pré-tratamento com ácido e, facilitando a consolidação do bioprocesso (CHEN; DIXON, 2007).

Desse modo, torna-se interessante conhecer toda a via de biossíntese da lignina, desde os genes que controlam toda a regulação da via, bem como os fatores de transcrição (FTs). Os FTs têm sido usados para melhor compreender as vias biossintéticas que levam à formação da PCS (ZHAO; DIXON, 2011; GREY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; HUSSEY et al., 2013).

Um desses FTs é o FT SHN pertence à família AP2 / ERF (Ethylene Responsive Factor) e ao clado SHINE / WAX INDUCER (SHN / WIN) (AHARONI et al., 2004). Em *Arabidopsis*, foram encontrados três representantes desta subfamília (*AtSHN1*, *AtSHN2* e *AtSHN3*) que possuem diferentes funções e locais de expressão na planta. *AtSHN1* apresentou a função de síntese de cera na cutícula das folhas, conferindo a elas um aspecto brilhante, e atribuindo nome ao gene (AHARONI et al., 2004).

No entanto, a superexpressão de *AtSHN2* em arroz (*Oryza sativa*) mostrou que SHN provavelmente está envolvido na biossíntese de PC, aumentando a celulose e diminuindo o conteúdo de lignina em plantas transgênicas (AMBAVARAM et al., 2011).

Embora existam muitos estudos envolvendo a análise de FTs na síntese de PCS em dicotiledôneas, pouco se sabe sobre sua ação em culturas de grande importância agrônômica, como as monocotiledôneas arroz e cana-de-açúcar (AMBAVARAM et al., 2011; HANDAKUMBURA; 2006).

A expressão de *ShSHN1* foi determinada em tecidos de alta biomassa em cana-de-açúcar (BRITO et al., 2015) e posteriormente foi superexpressos em plantas de arroz, resultando em plantas com aumento da biomassa de até 340%, até 209% a mais de pectina e 35 % menos lignina (MARTINS et al, 2018). Além disso, observou-se que essas plantas apresentaram melhora de 60% na sacarificação em relação às plantas NT (MARTINS et al, 2018). Dessa forma, o SHN se mostra como um candidato potencial para a obtenção de plantas geneticamente modificadas, visando superar as limitações na produção de etanol 2G na indústria.

No Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais, a cana-de-açúcar é uma importante cultura comercialmente importante, fonte de sacarose e produtora de biomassa (INMAN-BAMBER; SMITH 2005) e sua transformação genética tem sido utilizada para superar as limitações do melhoramento genético convencional (DAL-BIANCO et al., 2010).

Continuando o trabalho anterior de nosso grupo, foram transformadas cana-de-açúcar e cana energia para superexpressão de *ShSHN1* e então estes eventos foram avaliados quanto ao crescimento, composição bioquímica de PC (lignina e polissacarídeos) e eficiência de sacarificação. Os resultados aqui apresentados mostraram novos achados sobre o modo de regulação do SHN nos genes da via PC da cana-de-açúcar.

Em uma perspectiva de longo prazo, espera-se que o conhecimento derivado desses estudos não apenas forneça informações importantes sobre o papel dos reguladores SHN em todo o reino vegetal, mas também forneça uma ferramenta poderosa para a engenharia metabólica de compostos fenólicos e de lignina para melhoramento tradicional ou por meio de transgênicos, com o consequente impacto na produção de etanol de segunda geração.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A Importância do Etanol de Segunda Geração

Atualmente há uma crescente demanda por fontes alternativas de energia usando matérias-primas renováveis, sustentáveis, eficientes e custo-efetivas, com menor emissão de gases relacionados ao efeito estufa (ZABED et al., 2016). Entre os motivos apontados para essa preferência estão o alto custo para produção da gasolina, uma possível escassez das reservas petrolíferas, devido ao aumento do consumo de combustíveis fósseis, além do aumento da conscientização social pela preservação ambiental (ZABED et al., 2016; HIMMEL et al., 2007).

Neste cenário, uma das alternativas promissoras para combustíveis fósseis é o biocombustível que corresponde à conversão da energia solar em biomassa, sendo esta biomassa, em forma de carboidratos complexos ou açúcares fermentáveis, convertida em bioetanol através da fermentação de açúcares solúveis (BANSAL et al., 2016; SOUZA et al., 2012).

O etanol possui um elevado teor de oxigênio, cerca de 35% em massa de etanol, que possibilita uma combustão mais limpa, além de melhorar o desempenho dos motores, resultando em uma menor emissão de poluentes (ABDALA, 2017). Além do mais, o etanol de cana tem taxas de redução entre 40 e 62% nas emissões de gases do efeito estufa quando comparado com a gasolina (WANG et al., 2012).

As matérias primas para produção de etanol podem ser divididas em três grupos, os açúcares, culturas amiláceas e biomassa lignocelulósica (ZABED et al., 2016).

Os açúcares advindos de caldo de cana-de-açúcar no Brasil e as culturas amiláceas, como milho nos Estados Unidos, são largamente utilizados para produção do chamado etanol de primeira geração (E1G), que é até o presente momento, a única fonte com capacidade de suprir a alta demanda por combustível renovável de baixo custo e de baixo poder poluente (SANTOS et al., 2012).

Apesar de suprirem o mercado atual, ainda há uma busca no desenvolvimento de técnicas que utilizem os resíduos da biomassa na produção de etanol, como a componente lignocelulósica, para a produção de etanol de segunda geração (E2G) (ZHENG et al., 2009). Para a produção de E2G, foi desenvolvida a cana energia (variedades como as *vertix* desenvolvidas pela Granbio) que possui o biotipo ideal, apresentando como características alto conteúdo de fibras e elevada produção de biomassa.

O E2G apresenta como benefício além da redução na emissão de carbono, o aproveitamento dos subprodutos do E1G, sendo que para uma tonelada de cana produz-se 100 litros de E1G e estima-se que para uma tonelada de bagaço e palha gere-se 200 litros de E2G (UNICA, 2019). Ademais, a composição do E2G é idêntica ao E1G, sendo que as diferenças entre os dois é a matéria-prima utilizada e o processo produtivo (RAÍZEN, 2014). Outro fator que deve ser frisado é que a produção de E2G não compete com a produção de alimentos e com o cultivo de terras agrícolas, pois os materiais lignocelulósicos são abundantes, sendo considerados muitas vezes como resíduos de outros processos produtivos (MORO, 2015).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (OGATA, 2013). A lignina, que está aderida à celulose na parede celular (PC), corresponde a um dos principais problemas para a produção de E2G (CHEN; DIXON, 2007). A lignina possui papel fundamental na planta, agindo como uma barreira natural e protegendo-a de agentes externos. No entanto, no processamento da matéria prima lignocelulósica na indústria de E2G, ela dificulta o acesso das enzimas ao substrato (celulose e hemicelulose) gerando baixos rendimentos de açúcares na hidrólise enzimática (ZABED et al., 2016; MORO, 2015). O pré-tratamento, que torna os polissacarídeos disponíveis, é a etapa chave na obtenção de celulose digerível, formando a menor quantidade possível de inibidores para os processos subsequentes (hidrólise para obtenção de açúcares fermentescíveis, fermentação dos açúcares em etanol e separação e concentração deste etanol) (ZUÑIGA, 2010). Contudo, esta etapa ainda não apresenta uma eficiência que seja considerada ideal. Para contornar esse obstáculo, modular a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de lignina vem sendo encarada como

uma estratégia para modificar este polímero de forma estrutural ou em quantidade.

1.2 Parede Celular Vegetal

A biomassa vegetal é composta de vários biopolímeros formando uma matriz reforçada por fibras das paredes celulares (PC) das plantas (BOMBLE et al., 2017). Esta PC é composta por três camadas distintas: a lamela média, PC primária e PC secundária (LAGAERT; BELIËN; VOLCKAERT, 2009). A lamela média é a camada mais externa da PC, que consolida a união entre células, PC primária e secundária (TAIZ; ZEIGER, 2013). A PC primária é depositada durante o crescimento celular, consistindo principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas, além de proteínas estruturais (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já a PC secundária é depositada após cessar o crescimento celular, internamente à PC primária e confere estabilidade mecânica a planta (POPPE; CORTEZ, 2012; TAIZ; ZIEGER, 2002), sendo composta de celulose e hemicelulose impregnados de lignina (BOMBLE et al., 2017).

A celulose é um homopolissacarídeo não-ramificado de glicoses unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -D (1,4) (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Sua estrutura apresenta regiões cristalinas altamente ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio e regiões menos ordenadas com orientação randomizada (TAIZ; ZEIGER, 2013; FARINAS, 2011). Representa 15 a 30% da massa seca de PC primária e até 40% de PC secundária (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. Tais açúcares são ligados entre si principalmente por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal ramificações laterais (FARINAS, 2011).

A lignina representa até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e pode atingir 40% do peso seco em teor de resíduos vegetais (FARINAS, 2011). Está presente principalmente em tecidos que

participam da condução de solutos e suporte mecânico, representando um conjunto de polímeros amorfos de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas (FARINAS, 2011). Sua estrutura é baseada em três precursores monoméricos os chamados monolignóis: alcoóis trans-p-cumarílico (H), trans-coniferílico (G) e álcool trans-sinapílico (S) (CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; FENGEL; WEGENER, 1989).

Devido à natureza fenólica da lignina, essa fração não pode ser diretamente convertida em etanol, sendo utilizada para a produção de energia pelo processo de combustão (LARSEN et al., 2008) ou para a conversão em outros bioprodutos de interesse comercial. Em madeiras macias foi realizada a remoção da lignina por oxigenação e foi observado que ao remover 67% da lignina obteve-se um aumento de até duas vezes na taxa de hidrólise da celulose (sacarificação) e praticamente três vezes os teores de açúcares resultantes (DRAUDE; KURNIAWAN; DUFF, 2001). Dessa forma, para a produção de E2G torna-se interessante sua remoção a fim de melhorar a digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica.

Vários estudos demonstraram que a recalcitrância da PC a conversão de etanol pode ser melhorada pelo silenciamento de genes que codificam enzimas participantes da via de biossíntese de lignina (ROHDE et al., 2004; CHEN; DIXON, 2007; HUANG et al., 2010). No entanto, vários trabalhos relataram alterações nas plantas decorrentes do silenciamento de genes de biossíntese de lignina, resultando em plantas com fenótipos anormais tais como xilema colapsado, mudança de coloração, colmo flexível e retardo de crescimento (VIGNOLS et al. 1995; BOUT; VERMERRIS, 2003; ZHANG et al., 2006; LI et al., 2009; SCHILMILLER et al., 2009; HUANG et al., 2010; GUI; SHEN; LI, 2011; XU et al., 2011; SABALLOS et al., 2012; OOKAWA et al., 2014).

1.3 Fatores de Transcrição, Parede Celular e Modificação da Biomassa

Fatores de Transcrição (FTs) correspondem a uma classe de proteínas que tem como principal característica a presença de um domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain* - DBD), que permite o ancoramento do FT em uma sequência de nucleotídeos específica do DNA (COOPER, 2000). FTs podem

interagir com outros reguladores transcricionais, ativando ou reprimindo a transcrição (RIECHMANN et al., 2000; UDVARDI et al., 2007; RUSHTON et al., 2008), sendo considerados reguladores mestres da expressão gênica (BOUHLEL; LAMBERT; DAVID-CORDONNIER, 2015). Cerca de 7% do genoma de plantas codifica FTs, evidenciando sua importância e complexidade na regulação da expressão gênica (UDVARDI et al., 2007; RUSHTON et al., 2008).

As vias de biossíntese que levam à formação da PC secundária são altamente reguladas a nível transcricional (CASSAN-WANG et al., 2013), sendo que a maioria dos FTs dessa via pertence a duas grandes famílias de FTs: R2R3-MYB e NAC (NAM / ATAF / CUC) (ZHONG; YE, 2007; WANG; DIXON, 2012).

Os primeiros reguladores da biossíntese de monolignóis foram identificados em *Antirrhinum majus*, sendo eles pertencentes à família MYB de FTs, denominados então *AmMYB308* e *AmMYB330* (MONTEIRO; PEREIRA; ABREU, 2004; TAMAGNONE et al., 1998). A partir deste ponto, muitos outros FTs foram descritos e caracterizados em diversas espécies, com atenção especial para *Arabidopsis* (GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012).

Recentemente, FTs têm sido utilizados como uma forma de engenheirar plantas, a fim de produzir compostos desejados, transpor estresses ambientais ou ainda melhorar um processo industrial. Yang et al. (2012) reduziram a biossíntese de lignina em xilema ao trocar o promotor da enzima C4H pelo promotor do FT VND6, um promotor específico de xilema. As plantas exibiram fenótipos normais sem qualquer comprometimento no seu desenvolvimento. Além disso, plantas com aumento do espessamento da PC foram obtidas ao colocarem o gene do FT NST1 sob controle do promotor do gene IRX8, uma glicosiltransferase de PC secundária (YANG et al., 2012). Nos dois casos, as plantas obtidas apresentaram uma maior produção de açúcares após sacarificação. Aharoni et al. (2004) e posteriormente Ambaravaram et al. (2011), identificaram e caracterizaram FT *SHINE*, que se mostrou importante para a formação e composição da PC secundária, podendo ser considerado um regulador máster em sua síntese.

1.4 O Fator de Transcrição **SHINE**

SHINE (SHN) pertence à família de FTs AP2/ERF, ou AP2/EREB, e ao clado SHINE/WAX INDUCER (SHN/WIN) (AHARONI et al., 2004; AMBAVARAM et al., 2011). À família AP2/ERF é uma das três maiores famílias em *Arabidopsis* (RIECHMANN et al., 2000), é caracterizada por apresentar o domínio AP2, que consiste em cerca de 60 a 70 aminoácidos (NAKANO et al., 2006). Estas proteínas reguladoras estão envolvidas no controle do metabolismo primário e secundário, em vias de crescimento e desenvolvimento, além de participar em respostas aos estímulos ambientais (LICAUSI; OHME-TAKAGI; PERATA, 2013). Em *Arabidopsis*, foram caracterizados três representantes: o *AtSHN1*, o *AtSHN2* e o *AtSHN3* (AMBAVARAM et al. 2011), tendo o *AtSHN1* a função de síntese de cera na cutícula das folhas em *Arabidopsis* (AHARONI et al., 2004). A superexpressão de *AtSHN1* também alterou a estrutura epidérmica das folhas, o número de tricomas, ramificações e estômato, que podem contribuir para a tolerância à seca (AHARONI et al., 2004). Ambavaram et al. (2011) superexpressaram o *AtSHN2* em arroz (*Oryza sativa*) obtendo como resultado um aumento significativo de celulose, enquanto a quantidade de lignina, por sua vez, diminuiu. Jäger et al. (2015) ao superexpressarem um *TaSHN* (*SHN* de trigo, monocotiledônea) em *Arabidopsis* perceberam que as plantas obtidas apresentaram folhas brilhantes, proliferação desorganizada da cutícula em folhas, diminuição do número de estômatos por área foliar, sem alteração da resistência à seca.

Trabalhos conduzidos por nosso grupo de pesquisa têm tentado elucidar o modo de regulação do SHN sobre os genes da via de PC. Anteriormente, Martins et al. (2018) obtiveram plantas de arroz superexpressando o FT *SHN* de cana-de-açúcar (*ShSHN1*), as quais apresentaram aumento de biomassa de até 340%, até 209% mais pectina e 35% menos lignina. Além disso, foi observado que essas plantas apresentaram sacarificação 60% melhor que as controles.

Diante dos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em arroz, o SHN mostra-se como potencial candidato para obtenção de cana-de-açúcar e cana energia geneticamente modificada, visando superar as limitações na produção do E2G na indústria.

1.5 Cana-de-açúcar e cana energia

A cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais importantes do Brasil, utilizada como matéria prima para produção de açúcar e bioetanol. Ela é uma gramínea que pertence à família *Poaceae*, originária na Nova Guiné. Atualmente no Brasil, sua área total estimada de plantio é de 8.409,8 mil hectares, com produtividade média de 76.348 kg/ha e produção de 642.069,7 mil toneladas (CONAB, 2021).

Após seu processamento, há a formação de uma grande quantidade de bagaço, um resíduo fibroso que consiste em cerca de 32-45% de celulose, 20-32% de hemicelulose, 17-32% de lignina e de 1-9% de outros componentes (ARNI, 2018). Novos estudos com sequências de cultivares modernos de cana-de-açúcar sugeriram a existência de três genomas fundadores (A, B, C), dos quais, dois genomas (A e B) foram contribuições de *S. officinarum*, e um genoma (C) foi contribuição de *S. spontaneum* (POMPIDOR et al., 2021).

Os programas de melhoramento de cana-de-açúcar sempre fizeram um grande esforço para aumentar a produtividade da cultura e consequentemente a quantidade de açúcar. No entanto, alguns programas de melhoramento estão buscando um novo tipo de cana, direcionado para alto rendimento de fibra (CARVALHO-NETTO et al., 2014).

A cana energia representa um biótipo de cana com elevada capacidade de produção de biomassa, alto rendimento de fibra, mais vigorosa e rústica. Comparada à cana-de-açúcar tradicional são consideradas menos exigentes em solo, clima, água e nutrientes, mais resistentes a pragas e doenças, o que traz uma série de vantagens econômicas e ambientais (CARVALHO-NETTO et al., 2014).

Uma vez que a transformação genética da cana-de-açúcar tem sido usada para transpor as limitações do melhoramento genético convencional (DAL-BIANCO et al., 2010), este trabalho objetivou a modificação genética da cana-de-açúcar e cana energia, por meio da superexpressão de *ShSHN1* visando melhoria na produção de E2G e consequente aumento da produtividade de etanol.

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo principal avaliar o efeito da superexpressão de SHINE de cana-de-açúcar (*ShSHN1*) na parede celular de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 e cana energia variedade Vx12-1744.

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- 1) Obter vetor pJFNPTII contendo o cassete de superexpressão de *ShSHN1* (pOESHN);
- 2) Transformar *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor pJFNPTII::*ShSHN1* para posterior transformação genética de cana-de-açúcar;
- 3) Determinar os níveis de expressão de *ShSHN1* nos eventos transgênicos de cana-de-açúcar e cana energia obtidos;
- 4) Avaliar biometricamente os eventos de cana-de-açúcar superexpressando *ShSHN1*;
- 5) Analisar a composição da parede celular dos eventos transformados (cana-de-açúcar e cana energia) e compará-los com os não transformados (NT);
- 6) Avaliar a sacarificação da biomassa dos eventos transformados (cana-de-açúcar e cana energia) superexpressando *ShSHN1* comparando com os eventos NT;

3. MATERIAL E MÉTODOS

O seguinte projeto baseou-se nos experimentos resumidos na Figura 1, iniciando-se com a construção do vetor e transformação de *A. tumefaciens*, que foram enviados à empresa Pangeia para transformação de cana-de-açúcar. As plantas transformadas foram então verificadas para saber se apresentavam o cassete de superexpressão e então selecionadas quanto à fenótipo e nível de expressão do gene inserido após estarem em casa de vegetação por 30 dias. Aos 8 meses, elas foram selecionadas de acordo com melhores fenótipos aos dos NT e 26 foram selecionadas para análises de lignina e razão S/G em folhas. Aos 11 meses, foram realizadas análises biométricas e as plantas foram cortadas e 10 plantas com maior quantidade de massa seca e com outros parâmetros biométricos superiores a NT foram selecionadas.

Após o corte, plantas aos 8 meses, já na geração T1, foram avaliadas quanto a lignina, componentes de PC e sacarificação em entrenó 8 do colmo. Além disso, em folha, foram analisados os níveis de expressão de alguns genes relacionados a PC.

Paralelamente também foram transformadas canas energia, em parceria com a empresa Granbio. Assim como para cana-de-açúcar, aos 30 dias de plantio em casa-de-vegetação, as plantas foram selecionadas quanto ao fenótipo, testadas para checagem da presença do gene e para avaliação do nível de expressão de *ShSHN1*. Aos 10 meses, elas foram selecionadas quanto ao fenótipo e nível de expressão para avaliação de componentes de PC, lignina e sacarificação em colmo. Aos 12 meses, foram realizadas seleções biométricas que ajudaram na seleção de plantas superiores. Tais experimentos são descritos mais detalhadamente abaixo nos itens de 3.1 a 3.7.

Figura 1 - Fluxo de trabalho desenvolvido durante a realização do projeto

3.1 Obtenção de dados Genômicos de ShSHN1

A partir de dados do sequenciamento do vetor pDESTSHN, obtido anteriormente por Martins et al., (2018), foi obtida a sequência de *ShSHN1* transcrita, que foi verificada no Sugarcane Functional Genomics Database (Sucest – Fun).

3.2 Obtenção do Vetor e Transformação de *Agrobacterium*

Colônias de *E. coli*, previamente transformadas com o vetor pDESTSHINEA7, obtidas por Martins (2017), contendo sequência codificadora do gene *SHINE* de cana-de-açúcar, foram isoladas em meio LB sólido (25mg/mL de estreptomicina e 50 mg/mL de espectinomicina) com crescimento *overnight* a 37°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônia foi utilizada para confirmar a presença do SHN, sendo que cada reação foi composta de buffer 10x Mg Plus, 0,3mM de dNTPs, 7,5 mM de *primer* Fw e Rv (Tabela 1), 0,75U

de Taq DNA Polimerase (Sinapse), 2 µL de água autoclava contendo a colônia em volume final de 15 µL.

Tabela 1 - *Primers* utilizados em PCR de confirmação da presença do gene

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Referência
SHN ATG KOZAC – Fw	ATGACAGAGAATCTCCACTC	MARTINS (2017)
SHN stop1 – Rv	CAAGGTCGCTTCATCATCTGA	
UBQ – Fw	GCAGACTACAACATCCAGAAGG	
SHN SHN92	CACAGTCCACATCAGCAACA	
T35S	CGGGGGATCTGGATTTTAGTA	

O DNA plasmidial de uma das colônias foi isolado utilizando o kit *Wizard Plus SV miniprep DNA purification System* (PROMEGA), seguindo orientações do fabricante.

Para a obtenção do vetor de superexpressão pOEShSHN (Figura 2c) utilizado na transformação genética de cana-de-açúcar, o cassete de superexpressão de *ShSHN1* (inserto de interesse) que estava contido no vetor pDESTSHNA07 (Figura 2a) e o vetor de destino pJFNPTII (Figura 2b) gentilmente cedido por Fredy Altpeter da Universidade da Flórida (ALTPETER et al., 2000), foram digeridos com as enzimas 10U de *BamHI*-HF e 10 U de *HindIII* a 37°C por 3 horas.

Figura 2 – Sítios alvos das enzimas de restrição usadas na digestão dos vetores pDESTSHNA07 e vetor pJFNPTII. (a) Sequência do cassete de expressão de *ShSHN1* contido no vetor pDESTSHNA07 e sítios de restrição das enzimas *BamHI*-HF e *HindIII*. (b) Mapa do vetor pJFNPTII (ALTPETER et al., 2000) e sítios de restrição das enzimas *BamHI*-HF e *HindIII*. (c) Vetor de superexpressão de *ShSHN1* (pOESHN).

O inserto de interesse foi isolado de gel de agarose 0,8%, utilizando o *kit Pure Link Quick Gel Extraction* e purificado com o *PCR Purification Combo kit* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A purificação do DNA do vetor pJFNPTII foi realizada utilizando o método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A reação de ligação foi realizada com 88ng do vetor pJFNPTII e 87ng do inserto, 0,5U de T4 DNA ligase (Invitrogen), e 5x *Buffer* de reação em volume final de 20µL. A reação foi encubada a 25°C por 1 hora para obtenção do vetor final pOESHN. Células de *E. coli* eletrocompetentes (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o vetor pOESHN. A seleção das colônias transformadas foi realizada pelo método de LB X-Gal (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), e a checagem das colônias positivas por PCR de colônia. Cada reação foi composta de buffer 10x Mg Plus, 3mM de dNTPs, 7,5 mM de *primer* Fw UBQ e 7,5 mM do *primer* Rv SHN stop1 (Tabela 1) 0,75U de Taq DNA polimerase (Sinapse), 2 µL de água mili-Q autoclavada contendo a colônia, em volume final de reação de 15µL.

Uma colônia de *E. coli* positiva para a presença do vetor pOESHN foi selecionada e seu DNA plasmidial foi isolado utilizando o kit *Wizard Plus SV miniprep DNA purification System* (PROMEGA), seguindo orientações do

fabricante. O vetor foi então inserido em *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 por eletroporação. A checagem das colônias positivas por PCR de colônia composta de buffer 10x Mg Plus, 3mM de dNTPs, 7,5 mM de *primer* Fw SHN ATG KOZAC e 7,5 mM do *primer* Rv SHN stop1 (Tabela 1) 0,75U de Taq DNA polimerase (Sinapse), 2 µL de água mili-Q autoclavada contendo a colônia, em volume final de reação de 15µL.

3.3 Material Vegetal e Transformação Genética

A variedade SP80-3280 foi escolhida para ser transformada (Figura 3) por se tratar de um genótipo padrão em procedimentos de transformação genética, além possuir o genoma parcialmente sequenciado, o que dará suporte para as futuras análise de RNA-Seq (FIGUEIRA, 2012; MATTIELLO et al., 2015; BATISTA, 2016; RIAÑO-PACHÓN; MATTIELLO, 2017). As plantas transgênicas utilizadas neste trabalho foram produzidas anteriormente pela empresa Pangeia Biotech/Plant Transformation Facility, Campinas, SP, sob financiamento do projeto Jovem Pesquisador FAPESP2014/08468-4, coordenado pelo Dr. Michael dos Santos Brito. As plântulas transformadas foram enviadas para o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana - Instituto Agrônomo, Ribeirão Preto – SP, onde foram aclimatadas em casa-de-vegetação para condução dos experimentos.

Figura 3 - Transformação de *calli* embriogênicos e seleção de eventos transformados de cana variedade SP80-3280. A: *calli* embriogênicos transformados com cassete de expressão de ShSHN1; B: crescimento das plantas transgênicas em meio seletivo contendo geneticina; C: Eventos transgênicos e plantas controle em fase de aclimação.

Além da SP80-3280, a variedade Vx12-1744 de cana energia também foi escolhida para ser transformada para melhoria da biomassa (Figura 4), uma vez que ela foi o biotipo de cana desenvolvido para produção de etanol celulósico, apresentando como características alto conteúdo de fibras, elevada produção de biomassa. Os eventos transgênicos foram produzidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana - Instituto Agrônomo, Ribeirão Preto – SP, em um projeto em parceria da empresa Granbio. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até serem enviadas para plantio na sede da Granbio em Maceio- AL. Os eventos transformados foram clonados via muda pré-brotada (MPB), e plantados a campo em Alagoas, utilizando como delineamento experimental blocos casualizados, com quatro repetições e parcelas de três sulcos duplos (0,90 x 1,5m), com 10 m de comprimento.

Figura 4 - Transformação de *calli* embriogênicos e seleção de eventos transformados de cana Vx12-1744 (Vertix 2). A: *calli* embriogênicos transformados com gene *ShSHN1*; B: regeneração em meio seletivo contendo geneticina; C: Eventos transgênicos e plantas controle em fase de aclimação.

3.4 Caracterização Molecular

3.4.1 Confirmação de Inserção do transgene

Para a análise da presença do cassete de expressão nos eventos obtidos, DNA de folhas dos eventos mantidos em casa-de-vegetação, foi extraído com o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as orientações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada com o *primer forward* anelando no SHN SHN92 (Tabela 1) e o *primer reverso* anelando na região T35S (Tabela 1), conforme descrito previamente por Martins (2017), em que se exclui a amplificação do gene SHN endógeno de cana. Reações de qPCR, em duplicata técnica, foram constituídas de SYBR 2X; 0,25 µL de cada *primer* (10µM); 3µL de DNA genômico (100 ng) em volume final de 10 µL. A

amplificação foi conduzida em termociclador BIO-RAD IQ5, com ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 95°C por 10 s e 55°C por 30 s. Ao final, foi realizada a curva de *melting* (aumento de 0,5°C a cada ciclo, 81 vezes).

3.4.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise da expressão de ShSHN1

Para a análise da expressão de ShSHN1 nos eventos transformados, RNA total foi extraído de folhas +1 utilizando-se TRIZOL (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado em *NanoDrop*[®] (Thermo)[®] e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A fim de se obter um RNA livre de DNA genômico, 1 µg de RNA foi tratado com DNase RQ1 (Promega), em reação incubada a 37°C por 30 min, seguida da adição de 0,5 µL de *stop solution* e incubação por 10 min a 65°C, com a finalidade de paralisar a reação.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o Kit comercial *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas técnicas, constituídas de 5 uL de *SYBR GoTaq*[®] *qPCR Master Mix* (Promega), 3 uL do cDNA diluído 1:20 (v:v), 0,25 mM *primers* SHN 113 Fw e Rv (Tabela 2) em volume final de reação de 10 µL. A amplificação ocorreu de termociclador iQ5 multicolor Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad), com ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos por 40 ciclos de desnaturação 95 °C por 30s, anelamento 60°C por 30s, extensão 72°C por 40s e extensão final a 72 °C por 10 min, seguida de curva de *melting*.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para quantificação da expressão de *ShSHN1* e dos genes relacionados à PC.

Gene	Sequencia do <i>primer</i> (5' – 3')	Referência
SHN 113 – Fw	CCACTCCAGGAAAATGGTACA	Martins, 2017
SHN 113 – Rv	CCAGCCAGACCCTCCTCTTA	
GAPDHi – Fw	TTGGTTTCCACTGACTTCGTT	Iskandar et al., 2004
GAPDHi – Rv	CTGTAGCCCCACTCGTTGT	
4CL Fw	AAATCCCTGTGCGCTTCATC	Llerena et al., 2019
4CL Rv	CTTGTAGAACACGACCTCCTTG	
C3H Fw	GTCATGTTAGAGACCGACTTCC	
C3H Rv	TAGCCACCGATCTTGACATTC	
C4H Fw	CTTCCTGGAGGAGGAGAAGA	
C4H Rv	CAGGGTGATGCCGATGATAG	
CAD Fw	CCAGTTCTGCGTCGACAA	
CAD Rv	CGGTAGCGGACGTCGTT	
COMT Fw	CGCAGATCAAGGGCATCAA	
COMT Rv	CGGCACCGACTTGAACAT	
F5H Fw	AGGACCAGGAGGAGTTCAT	
F5H Rv	AGGAAGTCGCCGATGTTG	
HCT Fw	CTACTTCGGCAACGTGATCTT	
HCT Rv	AGTACCCGTCGTCCATCC	

Para o cálculo da expressão gênica relativa, foi utilizado o método do $\Delta\Delta C_t$ comparativo. Os valores de C_t gerados foram transformados em $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) para realização das análises estatísticas, seguida de normalização pelos genes constitutivos.

3.5 Avaliações Biométricas

As avaliações biométricas dos eventos transformados de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 foram realizadas em dois ciclos: cana planta (T_0), proveniente do cultivo *in vitro* e com oito meses de desenvolvimento em casa-de-vegetação; e cana-soca (T_1), proveniente da brotação após o primeiro corte de cana com 10 meses de desenvolvimento, seguindo método proposto por

Landell e Silva (2000). Foram avaliados comprimento e diâmetro do colmo, comprimento e largura da folha +1, número de perfilhos, número de gemas e número de folhas verdes, peso seco dos eventos (Figura 5).

Figura 5 – Locais de medições biométricas em cana-de-açúcar. Comprimento do colmo desde o corte na base até a primeira lígula aparente, diâmetro do colmo medido na metade do mesmo, comprimento e diâmetro da folha +1 (com primeira lígula aparente) e número de folhas verdes. (modificado de Paes; Oliveira, 2005)

As avaliações biométricas dos eventos transformados de cana energia variedade Vx12-1744 foram realizadas num total de 140 eventos plantados em campo na cidade de Maceió-AL, em parceria com a empresa Granbio (dados não mostrados). O experimento foi avaliado aos 12 meses de idade, considerando os parâmetros: diâmetro do colmo (em centímetros), porcentagem de fibra, perfilhamento por metro, tonelada de massa verde por hectare (TMVH), tonelada de massa seca por hectare (TMSH) e toneladas de fibra por hectare (TFH).

3.6 Análises Bioquímicas e Sacarificação

As análises bioquímicas e de sacarificação foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Mazzafera, Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LaFiMP) na Universidade Estadual de Campinas.

Nos eventos T_0 , as análises foram realizadas em 26 eventos transgênicos, utilizando-se a folha +3, com idade de seis meses, mantidas em vaso em casa de vegetação. Nos eventos T_1 , as análises foram realizadas em 10 eventos, em plantas com idade de sete meses, em porções do colmo, (oitavo entrenó - Figura 6), o qual foi separado em miolo e casca. As amostras foram liofilizadas em liofilizador BenchTop Pro with Omnitronics da SP Scientific (país e estado), e armazenadas para análises posteriores.

Figura 6 – Materiais coletados para análise de celulose, hemicelulose, pectina, lignina, razão S/G e sacarificação.

Para a variedade Vx12-1744, dez eventos foram selecionados com base na identidade com o material original NT e que apresentaram elevado potencial de produção. Destes, amostras de colmos inteiros, de plantas de idade de 10 meses, com uma única repetição (três plantas amostradas em bulk), foram submetidas as análises de componente de parede celular, tendo como objetivo avaliar o potencial agroindustrial da tecnologia.

3.6.1 Análise de Parede Celular – Pectina, Hemicelulose e Celulose

A determinação das porcentagens de celulose, hemicelulose e pectina foi realizada conforme a metodologia descrita por Chen et al. (2002) com as seguintes modificações: para cada 30 mg de amostra (folha e/ou colmo) foi acrescentado 1 mL de água gelada seguida de homogeneização e centrifugação a 12000 g por 10 min. O *pellet* foi recuperado e ressuspenso em 1 mL de água, sendo este processo repetido por quatro vezes. A seguir, o

pellet foi ressuspensionado em 1 mL de acetona P.A., homogeneizado e centrifugado a 12000 g por 10 min. A seguir, o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 1 mL metanol/clorofórmio (1:1, v/v). A solução foi homogeneizada em vórtex, sob agitação moderada e centrifugada a 12000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* tratado com 1 mL de 2 unidades.mL⁻¹ de amilase pancreática (tipo I-A, Sigma Chemical Co, St Louis, MO) em tampão 0,1 M de acetato de sódio (pH 6,5). A reação foi incubada a 37°C por 3 horas, seguido de centrifugação 12000 g por 10 min. para remoção do amido.

Para quantificação da pectina, o *pellet* obtido foi homogeneizado com 20 mM de oxalato de amônio (pH 4,0) a 70°C, durante 1 hora. Após, o extrato foi centrifugado a 12000 g por 10 min, e o sobrenadante transferido para um novo tubo, sendo o *pellet* armazenado para determinação da hemicelulose. Este processo foi repetido por três vezes. Ao final, aferiu-se o volume de sobrenadante das três lavagens, e procedeu-se a diluição em água na razão de 1:4 (sobrenadante:água).

Para quantificação da hemicelulose, foi adicionado ao *pellet* hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M à temperatura ambiente, seguido de agitação em vórtex para ressuspensão do *pellet*. A seguir, os tubos foram submetidos a vácuo de 500 mmHg durante 24 horas no escuro. Após, o material foi centrifugado 12000 g por 10 min e o sobrenadante coletado. Outras duas extrações com NaOH a 17,5% por 8 h, sob vácuo, nas mesmas condições foram realizadas. O material foi centrifugado e seu sobrenadante coletado. Ao final, o volume do sobrenadante das três lavagens foi reunido, e procedeu-se a diluição em água da porção miolo na razão de 1:50 (sobrenadante:água) e para a porção casca na razão 1:100 (sobrenadante:água).

O resíduo insolúvel foi lavado sequencialmente com água destilada, 1 mM de ácido acético e etanol 100%. A cada etapa foi realizada centrifugação a 12000 g por 10 min. Ao final, o *pellet* foi seco a 37°C *overnight*.

Para quantificação da celulose, o *pellet* seco foi dissolvido em solução 72% de H₂SO₄ durante 1 hora, homogeneizando a cada 10 minutos. Ao final, procedeu-se a diluição em água da porção miolo na razão de 1:100 (sobrenadante:água) e para a porção casca na razão 1:200 (sobrenadante:água).

O teor total de açúcares em cada fração foi obtido de acordo com o método do fenol sulfúrico em triplicata técnica, utilizando glucose como padrão (DUBOIS et al., 1956).

3.6.2 Porcentagem de Lignina – Brometo de Acetila

Para quantificação da lignina foi utilizado o método de brometo de acetila (AcBr) (JOHNSON; MOORE; ZANK, 1961), conforme descrito a seguir. Para cada 20 mg de amostra, foi adicionado 1 mL de água deionizada, sendo em seguida incubada a 98°C em banho seco Thermo mixer C (Eppendorf) por 30 min a 750 rpm. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por cinco minutos, sendo o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido por mais três vezes, alterando-se o solvente e a temperatura de incubação a cada repetição da seguinte forma: solvente etanol 100% a 76°C, seguido de clorofórmio P.A. a 59°C e acetona P.A. a 54°C. O *pellet* foi seco em estufa a 65°C e a massa seca foi pesada. Adicionou-se ao *pellet* seco 250 µL solução de AcBr (25% de AcBr em ácido acético (HOAc) 0,1M) e incubou-se a 50°C por 2 horas, seguido de 1 hora com agitação a cada 15 min. Após centrifugação a 12000 g por 5 min, adicionou-se aos 100 µL do sobrenadante, 400 µL de NaOH 2M, 75 µL de Cloridrato de Hidroxilamina 0,5M e 1425 mL de HOAc. Foram feitas no mínimo três leituras em Nanodrop para detecção de espectros de UV/Visível da lignina.

A quantidade de lignina em 20mg de massa inicial foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de lignina calculada} = \frac{\text{Média das 3 leituras}}{(\text{coeficiente} \times 0,1) \times \text{fator de diluição}}$$

Sendo:

coeficiente de gramíneas = 17,75 e fator de diluição = 5

Para obtenção da porcentagem de lignina total foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de lignina total} = \frac{\text{quantidade de lignina calculada}}{\text{massa seca}} \times 100$$

3.6.3 Razão S/G

A determinação da razão S/G foi feita de acordo com Mokochinski et al., (2015). Primeiramente, foi realizada a hidrólise das amostras adicionando-se 2 mL de NaOH₄ em 100 mg de amostra, e mantidos a 95°C por 24 horas em banho seco. Após resfriamento dos tubos, a reação foi neutralizada com 1,6 mL de HCl 6 M, seguida de centrifugação a 4000 g por 20 min. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi transferida para novo tubo, ao qual foi adicionado 1 mL de acetato de etila, seguida de centrifugação a 12000 g por 10 min. Ao final, 900 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado em geladeira. Ao restante do sobrenadante adicionou-se 1 mL de acetato de etila, o qual foi novamente centrifugado e outros 1 mL do sobrenadante armazenado (volume final armazenado 1,9 mL).

A amostra armazenada teve todo o solvente evaporado à temperatura ambiente em capela. O conteúdo restante foi dissolvido em 1 mL de água deionizada, e as amostras analisadas por UHPLC-MS.

3.7 Determinação da Porcentagem de Sacarificação

A determinação da porcentagem de sacarificação foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por BROWN; TORGET, 1996, com pequenas modificações: 500 µl de tampão [citrato de sódio (0,1 M, pH 4,8), 10 µL de azida de sódio 6,08 µL de uma mistura (1:4, v/v) de enzimas celulase (1,2 FPU/10 mg de celulose) e celobiose (1,26 U pNPGU/10mg celulose) em volume final de 1 mL] foram adicionados a 10 mg de celulose. Este coquetel foi preparado a partir de celobiose de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich) e celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich). A reação foi incubada a 50°C e 160 rpm durante cinco dias. Ao final as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min e a glicose foi determinada pelo método do fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) mediante a leitura no espectrofotômetro a 495 nm, usando uma curva padrão de glicose no intervalo 20-100 ug/mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização genômica de *ShSHN1*

A partir de análises anteriores foi possível identificar que o transcrito de *ShSHN1* é composto de 636 pares de base (pb) traduzidos em 212 aminoácidos (MARTINS et al., 2018). Ao utilizarmos a sequência transcrita de *ShSHN1* no banco de dados SUCEST – Fun foram obtidas 5 sequências idênticas à *ShSHN1*, com homologia de até 99% (Figura 7a). Através da comparação das sequências obtidas foi observado que o gene *ShSHN1* possui dois éxons e um íntron de 102 pares de base, possuindo um total de 738 pb do ATG inicial à sequência de parada TGA (Figura 7b). O íntron gênico está presente a 107 pb a partir do códon de iniciação, diferentemente de outros membros do clado SHN, como os três genes de *Arabidopsis* (AHARONI et al., 2004) e os dois genes de eucalipto (MARQUES et al., 2011), nos quais o íntron está posicionado a 80 pb do códon de iniciação, ou em *OsSHN1* (AHARONI et al., 2004) e *NUD* (TAKETA et al., 2008), nos quais o íntron está localizado 83 pb do códon de início. Através dessa análise foi possível detectar a possível sequência da região promotora de *ShSHN1* compreendida na região *downstream* do gene (em amarelo) e que há uma troca de base na posição 422 (a→g, em verde) (Anexo B). Tal alteração é considerada silenciosa, pois alterou um par de base por outro no códon, resultando num mesmo aminoácido (prolina), não alterando a proteína produzida.

a

Distribution of 99 Blast Hits on the Query Sequence

b

Query: 1	atgacagagaatctccactccaggaaaatggtacagccaaagaagtttcgtggagtcggg	60
Sbjct: 4130	atgacagagaatctccactccaggaaaatggtacagccaaagaagtttcgtggagtcggg	4189
Query: 61	cagcgccactggggttcctgggtctctgagatcaggcatccctcct	107
Sbjct: 4190	cagcgccactggggttcctgggtctctgagatcaggcatccctcct	4236
Query: 108	taagaggaggtctggtgggacaccttcgagactgctgaggaggcagcgagagcatatga	167
Sbjct: 4338	taagaggaggtctggtgggacaccttcgagactgctgaggaggcagcgagagcatatga	4397
Query: 168	cgaggctgccgtgctgatgagcgccgcaacgccaagaccaacttcccagtcctaaaggag	227
Sbjct: 4398	cgaggctgccgtgctgatgagcgccgcaacgccaagaccaacttcccagtcctaaaggag	4457
Query: 228	cagcacaggggagcctacccagctgcgggaaggatgctcgcgccggcagcggtcctc	287
Sbjct: 4458	cagcacaggggagcctacccagctgcgggaaggatgctcgcgccggcagcggtcctc	4517
Query: 288	taccgccaacctgtccagattctcagtgcgaaagctccgcaaatgctgcaaggcgccatc	347
Sbjct: 4518	taccgccaacctgtccagattctcagtgcgaaagctccgcaaatgctgcaaggcgccatc	4577
Query: 348	gccgtccctgacctgtctccgcttgacctgagaagtccacattggtgtttgacagaa	407
Sbjct: 4578	gccgtccctgacctgtctccgcttgacctgagaagtccacattggtgtttgacagaa	4637
Query: 408	gcgcgcaggagcccatgctgactccaactgggtcatgacctggagctcaacaaaggtgc	467
Sbjct: 4638	gcgcgcaggagcccatgctgactccaactgggtcatgacctggagctcaacaaaggtgc	4697
Query: 468	aacatccactgatgttgcatcacagtccacatcagcaacagctgctccaccagccacccc	527
Sbjct: 4698	aacatccactgatgttgcatcacagtccacatcagcaacagctgctccaccagccacccc	4757
Query: 528	gatggatgacgaggagaggatcgccctgcaaatgatcgaagagttgctgagcagcagcag	587
Sbjct: 4758	gatggatgacgaggagaggatcgccctgcaaatgatcgaagagttgctgagcagcagcag	4817
Query: 588	cccagcttcacctcgcatggagatgaccaaggtcgcttcacatcatctga	636
Sbjct: 4818	cccagcttcacctcgcatggagatgaccaaggtcgcttcacatcatctga	4866

Figura 7 - Dados genômicos de *ShSHN1* disponíveis no SUCEST – Fun. a. distribuição das sequências advindas do blast com a sequência de *ShSHN1*. b. Alinhamento da sequência de *ShSHN1* com a sequência do banco de dados. Em azul está demonstrado o local do íntron presente no gene.

4.2. Obtenção de vetor para superexpressão de ShSHN1 (pOESHN)

Um total de 18 colônias foram confirmadas como sendo positivas para o vetor pDESTSHINEA7 (MARTINS et al., 2018), utilizando-se os *primers* SHN ATG KOZAC – Fw e SHN STOP 1 – Rv (Figura 8).

Figura 8 – Eletroforese em gel de 1% agarose dos produtos de PCR de colônias de *E. coli*, para confirmação do cassete de expressão ShSHN1. Produtos de PCR com 636 pb amplificados com os *primers* SHN ATG KOZAC – Fw e SHN stop1 – Rv. M: marcador de 100pb, de 1 a 18 colônias transformadas; C-: controle negativo.

Para a presença do vetor final pOESHN, duas colônias de *E. coli* foram positivas, como pode ser observado na figura 9.

Figura 9 – Eletroforese em gel de 1% agarose dos produtos de PCR de colônias de *E. coli* para detecção da presença do vetor pOESHN. Produtos de PCR com 636 pb amplificados com os *primers* SHN ATG KOZAC – Fw e SHN stop1 – Rv. 2 e 7: inserto de 636 pb amplificado. M: Marcador molecular 100pb; C: controle negativo.

Após purificação do DNA plasmidial do vetor pOESHN contido em *E.coli*, este foi inserido por eletroporação em células de *Agrobacterium* cepa AGL1. Todas as 15 colônias testadas apresentavam o vetor pOESHN (Figura 10).

Figura 10 – Eletroforese em gel de 1% agarose dos produtos de PCR de colônias de *Agrobacterium* transformadas com o vetor pOESHN. A presença do vetor foi confirmada para todas as colônias selecionadas. Produtos de PCR com 636 pb, evidenciados no losango branco, amplificados com os *primers* SHN ATG KOZAC – Fw e SHN stop1 – Rv. M: marcador molecular de 100pb.

4.3. Cana-de-açúcar variedade SP80-3280

4.3.1 Plantas transgênicas variedade SP80-3280 superexpressando o fator de transcrição ShSHN1

Um total de 200 eventos transformados obtidos pela empresa Pangeia Biotecnologia, foram enviados ao laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana, onde foram cultivados *in vitro*, em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de vitaminas MS, 20 g/L sacarose, 20 mg/L do antibiótico Meropenem (para controlar a *Agrobacterium*) e 30 mg/L geneticina para seleção das plantas transformadas. As plantas foram cultivadas por 30 dias em sala de luz, a 26°C, fotoperíodo de 16 horas de luz, e intensidade luminosa de 1800 Lux (Figura 11).

Figura 11 – Cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, superexpressando *ShSHN1* e NT, em cultivo *in vitro*.

4.3.2 Rustificação das mudas e Implementação dos experimentos

Após 30 dias em frascos com condições ideais para crescimento das plantas, estas foram individualizadas em perfilho único e plantadas em substrato (Carolina Soil) em tubetes com a devida identificação (Figura 12). As plantas foram mantidas por 15 dias em estufa de alta umidade (UR 80%) e posteriormente para estufa de baixa umidade (umidade ambiente) e intensidade luminosa moderada (sombrite 40%) para finalizar a rustificação.

Figura 12 – Plantas de cana-de-açúcar superexpressando *ShSHN1* (transgênicas) e NT (controles) com um mês de desenvolvimento, em fase de rustificação em casa de vegetação de alta umidade.

4.3.3 Plantio em vaso dos eventos selecionados

Após 30 dias de desenvolvimento em tubetes, 180 eventos transgênicos (plantas T₀) e 20 NT (plantas não transformadas que passaram pelo cultivo *in*

vitro) foram transferidas para vasos de 5L em casa de vegetação, tendo sido utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com uma única repetição (eventos T₀ - Figura 13). Com o intuito de diminuir o número de eventos para uma próxima etapa de análises de expressão gênica, foi realizada uma primeira seleção fenotípica, buscando plantas com aparência semelhante ou superior ao controle. Dessa forma, 60 eventos apresentaram o padrão desejado e tiveram seu nível de expressão avaliado.

Figura 13 – Eventos de cana-de-açúcar transformados para superexpressão de *ShSHN1*. A: Plantas com quatro meses de desenvolvimento. B: Mapa da distribuição inteiramente ao acaso dos vasos de 5L em estufa. Em amarelo estão representadas plantas NT e em branco estão os eventos superexpressando *ShSHN1*.

Uma nova seleção foi realizada com as plantas aos oito meses de desenvolvimento, com base no nível de expressão de *ShSHN1*, sendo selecionados 26 eventos transgênicos e seis NT, os quais foram transferidos para vasos de 50 L (Figura 14).

Figura 14 - Eventos de cana-de-açúcar transformados para superexpressão de *ShSHN1* em vasos de 50L. A: Eventos selecionados e controles aos 11 meses de desenvolvimento. B: Mapa da distribuição dos vasos de 50L em estufa. Em amarelo estão representadas plantas NT e em branco estão os eventos superexpressando *ShSHN1*.

As plantas cultivadas em vasos de 50L foram selecionadas aos onze meses por análise do fenótipo com características mais próximas ou superiores às plantas NT e também por meio dos dados de lignina em folhas. Os eventos transgênicos selecionados foram cortados e deixadas para rebrotar (geração T₁) (Figura 15).

Figura 15 – Geração T₁ de eventos selecionados de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280, superexpressando *ShSHN1*, cultivados em vasos de 50L, em casa-de-vegetação.

Na figura 16, pode-se observar a diferença no desenvolvimento de um dos eventos transgênicos (T283A) comparado a um controle, aos quatro meses de desenvolvimento, após o segundo corte (ressoca), ambas advindas de cultura de tecidos e plantadas no mesmo dia. Essa mesma diferença visual na biomassa também pode ser observada por Martins et al. (2018) em plantas de arroz superexpressando *ShSHN1*, por Liu et al. (2017) em plantas do fumo superexpressando *PsnSHN2* (SHN de *Populus*) e por Wuddineh et al. (2015) com *switchgrass* superexpressando *PvERF001* (SHN de *switchgrass*), homólogo a *AtSHN2*. Essa observação com referência a este aumento de biomassa pode ser principalmente devido ao fato de que foi mostrado que SHN é um fator de transcrição possivelmente envolvido com o controle master de diferentes elementos que compõe a parede celular (GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012).

Figura 16 – Aspecto fenotípico de plantas de cana-de-açúcar NT comparada ao evento T283A superexpressando o gene *ShSHN1*.

4.3.4 Caracterização molecular

4.3.4.1 Primeira avaliação da expressão e seleção dos melhores eventos

Cerca de trinta dias após a transferência para casa-de-vegetação, 200 prováveis eventos transgênicos foram avaliados por PCR em tempo real, para detecção da presença ou ausência do cassete de superexpressão do FT *ShSHN1*. Destes, 199 eventos foram positivos para a presença do cassete de superexpressão.

Após, 30 eventos e quatro NT, foram selecionados com base no fenótipo para análise de expressão do *ShSHN1*. Os eventos selecionados apresentaram nível de expressão de *ShSHN1* até 3500 vezes maior (T140A) que NT (Figura 17).

Figura 17 – Perfil de expressão dos eventos transformados para superexpressão de *ShSHN1* e controles. NT representa a média dos controles e eventos iniciados com T indicam eventos superexpressando *ShSHN1*.

Essa amplitude no valor de expressão relativa pode ser decorrente do número de cópias do transgene inserido (KOHLI et al., 2006), visto que é esperado, caso não haja nenhum efeito de silenciamento, quanto maior o número de cópias do transgene, maior será o nível de expressão deste. Por outro lado, o local de inserção do transgene, também pode modular o nível de transcrito, uma vez que regiões do genoma conhecidas como *hotspots* representam sequências que possuem sinais para que haja uma intensa atividade de transcrição (ARENCIBIA et al., 1998; KOHLI et al., 1999). Entretanto, o fato de o gene estar sendo expresso não implica que a proteína esteja sendo traduzida, pois diferentes processos pós-transcricionais, processos durante a tradução e até mesmo pós-traducionais podem influenciar na presença do produto final (KOHLI et al., 2006).

A partir dos resultados do nível de expressão de *ShSHN1* (eventos transgênicos apresentando maiores níveis de expressão) e com análise de fenótipo (igual ou superior aos NT), foram selecionadas seis plantas controles e 26 eventos transgênicos os quais foram transferidos para vasos de 50L.

4.3.4.2 Segunda avaliação da expressão e seleção dos melhores eventos

Após oito meses de cultivo em vasos de 50L, os níveis de expressão de *ShSHN1* foram checados novamente com o objetivo de se avaliar a estabilidade da expressão do transgene. Na figura 18, pode-se observar que, dos eventos avaliados, apenas três não apresentaram novamente a superexpressão do gene *ShSHN1*, sendo eles T20A, T147A e T164A. Isto pode estar relacionado a mecanismos de silenciamento do transgene, comumente reportado em transformação de cana (BIRCH; BOWER; ELLIOTT, 2010).

Com base nos resultados aqui obtidos, foi identificado um grupo de plantas com maior expressão, dentre elas T283A, T86B, T301A, T118C, T135D e T140A. Juntamente com a análise dos dados de PC e sacarificação, esse grupo foi considerado como elite e foi selecionado para análise em uma próxima geração (T₂).

Figura 18 – Perfil de expressão de *ShSHN1* nos 26 eventos transgênicos e 6 controles selecionados, aos 8 meses de idade, em folha +1. NT é a média dos controles e não possuem *ShSHN1* superexpresso e os demais eventos são positivos para a presença cassete de superexpressão *ShSHN1*.

4.3.5 Análises Biométricas

Características biométricas podem facilitar a definição da melhor variedade a ser cultivada (OLIVEIRA et al., 2016). Os parâmetros biomassa

(massa seca), número de perfilhos e número de gemas foram avaliados em 23 eventos da variedade SP80-3280, mantidos em casa de vegetação, em vasos de 50L. Tais eventos foram previamente selecionados de acordo com dados de expressão e avaliação fenotípica, eventos que apresentaram maior rusticidade foram considerados com maior nota. Na determinação das características de qualquer forma de biomassa, a matéria seca ou peso seco é em geral uma medida dos sólidos contidos no material em análise, livre de água (TAVARES; SANTOS, 2013). O aumento da biomassa era esperado ao se transformar cana-de-açúcar para superexpressão de *ShSHN1*, assim como encontrado anteriormente por outros autores ao superexpressar o FT SHN em monocotiledôneas (WUDDINEH et al., 2015; MARTINS et al., 2018).

Os eventos T308A (310%), T98A (211%) e T152A (181%) apresentaram o maior aumento na biomassa, enquanto o evento T86B apresentou uma diminuição de aproximadamente 30% quando comparada as plantas NT (Tabela 3). O maior número de perfilho foi observado nos eventos T152A, T118C, T136B e T62A com aumento de até 130% neste parâmetro em relação as plantas NT (Tabela 3). Também, o evento T164A apresentou aumento de 120% no número de gemas em comparação as plantas NT (Tabela 3). Esse aumento provavelmente está relacionado ao maior número de perfilhos. O plantio de cana de açúcar ocorre por meio de propagação vegetativa, de forma assexuada sendo plantadas pequenas partes do colmo contendo gemas (LANDELL et al., 2013), e uma maior quantidade de gemas facilitaria o plantio de uma maior área com menos colmos de cana, tornando o processo menos oneroso. As gemas de cana também são utilizadas na nova tecnologia de Mudas pré-brotadas (MPB) (LANDELL et al., 2013), o que as torna extremamente importantes para a cultura.

Os resultados aqui apresentados corroboram com aqueles obtidos anteriormente por Wuddineh et al. (2015) e Martins et al. (2018). Martins et al. (2018) identificou 340% de aumento na biomassa seca em plantas de arroz superexpressando o FT *ShSHN1* de cana-de-açúcar. Wuddineh et al. (2015) ao superexpressar o PvERF001 (SHN de *Panicum virgatum*) em *Panicum* observou um aumento de até duas vezes da biomassa quando comparou suas linhagens transgênicas com os controles.

Tabela 3 - Massa seca (quilograma/evento), número de perfilhos por evento em vaso e número de gemas por evento em vaso da variedade SP80-3280 superexpressando *ShSHN1*.

EVENTOS	MASSA SECA	Nº DE PERFILHOS	Nº DE GEMAS
PLANTAS NT	1,13	6	36
T20A	2,38	5	38
T25A	1,98	7	39
T59A	2,13	11	59
T60A	2,57	11	75
T62A	2,47	14	66
T82C	2,04	8	51
T86B	0,81	12	27
T90A	1,64	11	41
T98A	3,55	11	68
T118C	2,3	14	59
T131A	2,6	8	47
T135D	2,65	11	62
T136B	2,64	14	55
T137C	2,31	9	53
T138C	2,54	11	58
T139B	1,83	10	42
T147A	2,23	12	61
T152A	3,21	14	70
T164A	2,46	11	80
T165A	2,53	10	52
T182A	1,87	7	32
T301A	2,04	6	42
T308A	4,68	*	38

*Dado não coletado

Uma nova coleta de dados biométricos foi realizada com cinco repetições em vasos de 50L em plantas T₁ em plantas com 15 meses de idade. Foram avaliados o peso da touceira no vaso, a altura total do perfilho principal, os diâmetros de todos os perfilhos por vaso e o número de perfilhos por vaso.

O evento T301A apresentou a menor média do peso das touceiras, apresentando 65% menos peso que NT (Figura 19A). Isto está associado a menor quantidade de perfilhos, que foi de 68% menos perfilhos que NT para este evento (Figura 19D).

Em geral a altura dos eventos superexpressando *ShSHN1* foi em média 16% menor que NT (Figura 19B).

Figura 19 – Análise biométrica de canas-de-açúcar variedade SP80-3280 superexpressando *ShSHN1*, NT (não transformadas) e SP80-3280 que não passou por cultura de tecidos. A. Peso da touceira por vaso; B. Altura total do perfilho principal; C. Média do diâmetro de todos os perfilhos por vaso e D. Número de perfilhos por vaso.

4.3.6 Análise de parede celular

A composição da PC é um dos principais fatores que influenciam, tanto de forma positiva como negativa, a conversão de biomassa vegetal em E2G (WILDHAGEN et al., 2017).

Folhas dos 26 eventos (T₀) da variedade SP80-3280, selecionados previamente por melhores níveis de expressão do transgene e fenótipos superiores aos dos controles, foram avaliados para os parâmetros de teor de lignina e razão S/G. Em geral, a superexpressão de *ShSHN1* resultou numa redução do teor de lignina na folha, visto que 22 eventos apresentaram uma redução deste biopolímero, variando de 59% (T139B) a 68% (T308A), enquanto apenas quatro eventos (T59A, T60A, T88A e T98A) tiveram sua lignina inalterada (Figura 20a). As reduções encontradas nesses eventos foram maiores do que as verificadas por Martins et al. (2018), que analisou a parte aérea de plantas transgênicas de arroz superexpressando *ShSHN1* e verificou uma redução máxima de 34,3% no teor de lignina destas plantas. Os níveis de redução verificados neste trabalho, também foram superiores àqueles encontrados por Liu et al. (2017) e Ambavaram et al. (2011), que obtiveram uma diminuição de 34% ao superexpressar *PsnSHN2* de *Populus* em planta do fumo e uma diminuição de 45% expressando o gene *AtSHN* de *Arabidopsis* em arroz, respectivamente. Uma possível explicação para nossos resultados serem maiores é de que neste trabalho a superexpressão do *ShSHN1* ocorreu na espécie de origem, facilitando assim o seu reconhecimento pelos genes-alvos na sua via metabólica.

Com relação as análises da razão S/G nas folhas, houve um aumento em todos os eventos avaliados, com variação de 4% (TC20A) a 71% (T182A), como pode ser observado na figura 20b. A redução na razão S/G foi maior que a encontrada em arroz superexpressando *ShSHN1* (34,3%) por Martins et al. (2018). Em diferentes famílias de *Populus* foram encontradas diferentes quantidades de lignina e razão S/G, sendo que na amostra com menor teor de lignina e razão S/G de 1,8 resultou em um maior rendimento xilose, principal açúcar pentose que compõe a hemicelulose (GÍRIO et al., 2010), o que demonstra que os dois fatores (lignina e razão S/G) estão relacionados com a hidrolisabilidade da biomassa (DAVISON et al., 2006). Em milho, a razão S/G demonstrou ser mais importante que a quantidade de lignina para a melhoria ou piora da degradação da lignina ($R^2=0,8$) (HE et al., 2017).

Figura 20 - Análise de teor de lignina e razão S/G de plantas T₀ da variedade SP80-3280 superexpressando *ShSHN1*, aos seis meses de idade. a. Teor de lignina determinada pelo método de brometo de acetila em folhas +3; b. Razão S/G em folhas +3 de cana-de-açúcar. Plantas não transformadas estão representadas em preto, eventos superexpressando *ShSHN1* estão representados em cinza.

A partir dos resultados obtidos com as análises biométricas e de parede celular em folhas, 10 eventos que apresentaram aumento de biomassa (em vaso) e melhor razão S/G foram selecionados para análises de componentes de lignina, razão S/G, parede celular (pectina, celulose e hemicelulose), e sacarificação em colmo. De acordo com Hoang et al. (2017) o colmo é responsável por cerca de 64% da biomassa total acima do solo, dos quais cerca de 90% estão presentes fibras e açúcares. Para isso, a porção do colmo que compreende o entrenó 8, previamente caracterizados para deposição de lignina e açúcares (LLERENA et al., 2019), foram separados em casca e miolo, conforme modelo previamente estabelecido por Brito et al. (2015) a fim de se verificar não só a quantidade de lignina, mas também se a deposição governada por *ShSHN1* está mais relacionada a vasos (casca) ou fibra (miolo).

Na figura 21a são mostrados os resultados obtidos para o teor de lignina na casca e miolo nos eventos selecionados da SP80-3280. Nota-se que, em casca, houve pouca alteração entre os eventos, com exceção do evento T118A que apresentou uma redução de 15%, enquanto se observou um aumento de 20% do evento T135D. Diferentemente, o teor de lignina no miolo reduziu em todos os eventos, variando de 8 a 47%, com exceção do evento T152A que não apresentou alteração. Assim, é possível sugerir que há uma tendência do gene *ShSHN1* atuar no controle da síntese de lignina preferencialmente no miolo do que na casca. Esses resultados corroboram com o estudo de Brito et al. (2015), o qual demonstrou que o gene *ShSHN1* tem maior expressão em

miolo do que na casca, reforçando a hipótese de ação deste gene de forma tecido-específica. No entanto, o miolo é um tecido (parênquima de reserva) muito menos lignificado do que a casca (parênquima clorofiliano), e pequenas modificações no miolo são mais expressivas do que na casca. Experimentos serão ainda realizados para se avaliar qual tecido (folha, miolo, casca) o gene *SHINE* é mais expresso, de forma a se poder propor novas estratégias visando direcionar sua expressão para um tecido específico.

Nos resultados da razão S/G (Figura 21b), nota-se uma tendência de aumento tanto para casca quanto para miolo. Os eventos T308A e T283A apresentaram um aumento na razão S/G de 40% na casca e 24% no miolo, respectivamente. Todavia, os eventos T138C e T165A apresentaram uma diminuição nessa razão de 29% e 24% na casca, e 11% e 14% em miolo, respectivamente. Portanto, com base nos dados de S/G mais alterados em casca, infere-se que *ShSHN1* atua mais na composição do que na quantidade de lignina em casca do colmo das plantas transgênicas da SP80-3280.

Monolignóis cumaril (H), coniferil (G) e sinafil (S) atuam como subunidades para a biossíntese da lignina (JARDIM-MASSÉDER et al., 2020). As subunidades G apresentam mais interligações, sendo mais recalcitrantes à hidrólise que as subunidades S (KIYOTA; MAZZAFERA; SAWAYA, 2012). A subunidade H é mais presente em gramíneas do que em dicotiledôneas (BARRIÈRE et al., 2007).

Ao contrário do que foi observado por Llerena et al. (2019), tanto para NT quanto para as plantas superexpressando *ShSHN1*, as subunidades G foram encontradas com menos frequência do que subunidades S (Tabela 4).

Todos os eventos apresentaram uma diminuição da subunidade S, quando comparadas às médias dos eventos NT em casca. O mesmo ocorreu para a subunidade H. Quanto a subunidade G, somente o evento T165A apresentou aumento de 16% quando comparado à média dos eventos NT em casca.

No miolo, todos os eventos superexpressando *ShSHN1* apresentaram diminuição das subunidades S e G. Para a subunidade H, foi observado um

aumento para os eventos T308A, T301A e T283A de 23%, 67% e 98%, respectivamente. Tais eventos foram os três que também apresentaram as maiores melhorias na sacarificação. Os dados aqui apresentados podem demonstrar que a subunidade H, juntamente com a quantidade de lignina e razão S/G também pode interferir no processo de hidrólise da biomassa, em miolo.

Tabela 4 – Quantidade em nmol por 100 mg de material dos monômeros de lignina em canas-de-açúcar variedade SP80-3280 NT e superexpressando *ShSHN1*.

QUANTIDADE (nmol) POR 100mg MATERIAL

AMOSTRAS	Casca			Miolo		
	S	G	H	S	G	H
NT	24,7236	4,5367	32,3044	38,3632	12,4050	40,8501
T118A	15,5346	2,5081	24,2897	34,5527	10,4925	32,1838
T131A	17,5226	2,9806	24,8640	31,9412	10,8213	29,9228
T135D	13,7493	2,2754	24,9690	31,0128	9,4423	38,8921
T136B	18,3156	3,2472	25,6293	35,2234	11,3325	37,3982
T138C	15,9174	3,9847	26,6974	27,1432	9,8814	33,7942
T152A	18,7388	3,4112	23,3585	36,5847	10,7242	26,8108
T165A	22,4008	5,2450	25,0843	25,1883	9,4838	34,5141
T283A	21,7049	3,9351	21,8671	20,7592	5,4238	78,1118
T301A	22,5865	3,8717	21,2233	30,4535	9,1743	66,1262
T308A	20,9178	2,6533	15,6026	30,7434	10,4509	48,5415

Atualmente há um crescente interesse em estudar modificações em pectina, por sua capacidade de formar géis aquosos, sendo utilizada como ingrediente gelificante, espessante e estabilizante na indústria alimentícia (CHEN et al., 2015) estando presente nas PCs de plantas superiores. Elas são abundantes em resíduos de frutas e vegetais, os quais podem ser usados como matéria-prima na produção de etanol, e são largamente solúveis em água, e comparado aos outros componentes da PC são mais fáceis de degradar (XIAO; ANDERSON, 2013). Além disso, os resíduos de pectina possuem baixos níveis de lignina, o que pode facilitar a desconstrução de suas PCs e reduzir o uso de enzimas degradativas (EDWARDS; DORAN-PETERSON, 2012).

A análise de pectina demonstrada na figura 21c mostrou que, em casca, houve diminuição em todos os eventos, a qual variou de 20% (T136B) a 53%

(T118A). Por outro lado, em miolo, os eventos T138C, T118A, T283A e T135D aumentaram o conteúdo de pectina de 11% a 59%, enquanto os outros seis eventos apresentaram uma redução de 15% (T165A) a 64% (T152A). O aumento de pectina regido pelo FT SHN também foi encontrado por Martins et al. (2018), utilizando partes aéreas de arroz superexpressando *ShSHN1*, sendo observado aumento variando de 26-209% de aumento de pectina.

A hemicelulose vem sendo usada como fonte alternativa para a produção de biocombustíveis, sendo relatados aumentos de 70% no rendimento de etanol (CANNELLA; SVEDING; JØRGENSEN, 2014; THOMSEN et al., 2015). Assim, considera-se importante sua quantificação para seleção do melhor evento.

O conteúdo de hemicelulose (Figura 21d) avaliado apresentou aumento na casca dos eventos T165A (64%), T308A (36%) e T283A (31%), e no miolo dos eventos T138C (58%), T165A (41%) e T118A (26%). Contudo, também foram observados eventos com redução de até 52% da hemicelulose em casca (T131A) e de até 66% em miolo (T301A). Um aumento de hemicelulose foi reportado por Liu et al. (2017), que, ao superexpressarem *PsnSHN2* em planta do fumo, obtiveram aumento de 28% da hemicelulose nos eventos transgênicos.

Assim como os demais componentes da PC, houve variação no teor de celulose entre eventos avaliados (Figura 21e). Para casca, seis eventos apresentaram aumento de 17% (T135D) a 98% (T136B) de celulose, enquanto no miolo o aumento variou 8% a 59% (T152A, T165A, T136B e T138C). Por outro lado, os eventos T131A, T308A, T118A e T301A apresentaram uma redução de 9% a 17% da celulose na casca, e de 24% a 63% no miolo. O aumento da celulose regido por SHN, também foi observado por Liu et al. (2017) em planta do fumo superexpressando *PsnSHN2*, que aumentaram 37% no teor de celulose, e Ambavaram et al. (2011) em arroz superexpressando o gene *AtSHN* de *Arabidopsis*, com aumento do conteúdo de celulose de 34%.

A sacarificação enzimática é um processo efetivo para aumentar a produção de açúcares redutores, como a glicose e a frutose, a partir de

açúcares poliméricos como a celulose em biomassa lignocelulósica (MANISHA, 2017).

A sacarificação apresentou uma melhoria de 41% (T138C) a 465% (T301A) em miolo, e também uma redução de 19% a 66% (T165A, T152A e T135D). Em casca, metade dos eventos avaliados apresentaram aumento de 6% (T118A) a 151% (T301A), enquanto os outros eventos mostraram redução de 3% (T138C) a 63% (T165A), como se observa na figura 21f. Diferentemente da correlação entre aumento de pectina e melhoria da sacarificação observada por Martins et al. (2018) em arroz, os resultados obtidos em casca e miolo da SP80-3280 não mostraram a mesma tendência.

Segundo Davison et al. (2006), não apenas a quantidade, mas também a composição (monômeros S e G) da lignina são fatores que impactam no processo de sacarificação. A relação entre a quantidade de monômeros S e G está envolvida com o grau e a natureza da condensação da lignina, diminuindo ou aumentando a recalcitrância da biomassa. Dessa forma, o aumento na relação S/G tem relação direta com o aumento da eficiência de sacarificação e se mostraram correlacionadas em casca e miolo como observado nos eventos T118C, T131A, T135D, T138C, T283A, T301A, T308A.

Diferentemente do padrão observado por Martins et al. (2018), não foi encontrado correlação entre a porcentagem de sacarificação e um aumento na quantidade de pectina. Acredita-se que a melhoria da sacarificação nas plantas superexpressando o FT *ShSHN1* possa estar relacionada tanto na diminuição da quantidade de lignina quanto na alteração da razão S/G. O trabalho de Martins et al. (2018) e o presente trabalho utilizaram o mesmo cassete de expressão (superexpressão de *ShSHN1*), porém, em modelos vegetais diferentes, arroz e cana-de-açúcar respectivamente. Apesar de tanto a cana-de-açúcar quanto o arroz serem plantas pertencentes a classe da monocotiledôneas, estas apresentam diferenças estruturais e metabólicas importantes. De forma complementar, foi proposto que alguns FTs podem exercer seu efeito de forma espécie-específica (GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012) e assim acredita-se que isto poderia explicar as diferenças observadas nos achados de Martins et al. (2018) e o presente

trabalho. A quantidade de lignina é um fator conhecido por impactar negativamente no processo de sacarificação (NOOKARAJU et al., 2013). A presença deste polímero associado à celulose ou hemicelulose forma uma rede na PC extremamente recalcitrante para a penetração e degradação de enzimas (ACHYUTHAN et al., 2010). Não só a quantidade, mas também a composição, da lignina tem efeito no processo de sacarificação (JACKSON et al., 2008; LI; PU; RAGAUSKAS, 2016; PEI et al., 2016). A relação entre a quantidade de monômeros do tipo S e do tipo G está envolvida com o grau e a natureza da condensação da lignina diminuindo ou aumentando a recalcitrância da biomassa (KIYOTA; MAZZAFERA; SAWAYA, 2012).

Avaliações futuras a partir de experimentação à campo, serão realizadas nos eventos T118C, T131A, T135D, T136B, T138C, T165A, T283A, T301A, T308A para validar os resultados aqui obtidos e selecionar o evento elite da SP80-3280.

Figura 21 - Análise de componentes da parede celular de plantas T₁ da variedade SP80-3280 superexpressando *ShSHN1*, aos oito meses de idade. (a) Teor de lignina; (b) Razão S/G; (c) Conteúdo de pectina; (d) Conteúdo de hemicelulose; (e) Conteúdo de celulose; (f) Porcentagem de sacarificação. Plantas não transformadas estão representadas por barras vermelhas; em preto e cinza estão representados os resultados para casca e miolo, nos eventos transformados.

4.3.7 Análise de expressão gênica de genes provavelmente relacionados a SHINE nas plantas *ShSHN1*

De acordo com os resultados apresentados nas análises bioquímicas e de sacarificação, os eventos T136B, T138C, T165A, T283A da variedade SP80-3280 foram selecionados e plantados em repetição (T₁) para avaliar a expressão de 7 genes envolvidos na via de biossíntese da lignina: C3H (p-coumaroylshikimate 3'-hydroxylase), HCT (hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quininate p-hydroxycinnamoyl-transferase), 4CL (4-hydroxycinnamoyl CoA: ligase), F5H (ferulate 5-hydroxylase), COMT (caffeate O-methyltransferase), C4H (cinnamate 4- hydroxylase), e CAD-B (cinnamyl alcohol dehydrogenase). Tais enzimas desempenham papéis importantes em etapas específicas da biossíntese de monômeros de lignina. Em geral, mudanças nas expressões de C4H, C3H, HCT ou 4CL levam a mudanças quantitativas nos níveis de lignina, enquanto a regulação de F5H e COMT leva a mudanças na razão S/G e, conseqüentemente, no tipo de lignina (CHEN; DIXON, 2007). As enzimas CAD catalisam a última etapa da biossíntese do monolignol e pode ter contribuído para a diversidade de lignina nas plantas (GUO; RAN; WANG, 2010).

O perfil de expressão do gene *ShSHN1* foi reconfirmado nos eventos selecionados. A figura 22a mostra alta abundância de transcritos nos eventos T136B (296 vezes) e T283A (233 vezes), seguida dos eventos T138C (96 vezes) e T165A (88 vezes) quando comparados as plantas NT.

Os genes C3H, e CAD-B não apresentaram diferença na expressão quando comparados as plantas NT em nenhum dos eventos avaliados (Figura 22b, h). A expressão dos genes C4H e 4CL, os eventos T283A e T138C apresentaram uma redução significativa de 2,2 e 2,4 vezes na expressão em relação as plantas NT, respectivamente (Figura 22c, f). Já para o gene F5H, em todos os eventos avaliados foi observado uma redução na expressão quando o gene *ShSHN1* foi superexpresso, sendo uma redução significativa de

1,5 vezes para os eventos T138C e T136B (Figura 22d). Na avaliação dos genes HCT, os eventos T136B apresentou aumento significativo de 2,9 vezes na expressão em relação as plantas NT, e uma redução de 1,5 vezes no evento T165A (Figura 22e). O mesmo perfil de expressão foi observado para o gene COMT, em que o evento T283A teve sua expressão aumentada em 1,8 vezes, enquanto os eventos T138C e T136B apresentaram redução significativa de 2,7 e 1,5 vezes em relação as plantas NT, respectivamente (Figura 22g).

A expressão de F5H apresentou correlação positiva com a razão S/G tanto em miolo quanto em casca dos eventos analisados. Enquanto para o gene COMT essa relação só foi encontrada para os eventos T138C e T136B. A mesma relação não foi encontrada em *S. spontaneum* e *S. officinarum* (Llerena et al., 2019). A relação entre diminuição da expressão e diminuição da razão S/G também foi observada para o gene HCT nos eventos T165A e T283A, assim como observado por Bottcher et al. (2013). Tais genes são codificados por genes únicos, diferentemente dos outros aqui analisados, os quais apresentam vários membros em suas famílias (BOTTCHER et al., 2013).

Em relação a quantidade de lignina nos eventos avaliados, para o gene COMT foi verificado uma correlação negativa nos eventos T136B e T283A, enquanto que para o gene HCT a correlação para os mesmos eventos foi positiva, em casca. Já em miolo, o evento T138C apresentou correlação positiva com COMT e negativa com HCT e o evento T165A apresentou correlação positiva com HCT e negativa com COMT.

Plantas de arroz superexpressando *ShSHN1* apresentaram menores expressões de genes relacionados à lignina (MARTINS et al.; 2018), o que vai de encontro com os resultados encontrados nas plantas de cana-de-açúcar superexpressando *ShSHN1* com exceção dos genes HCT no evento T136B COMT no evento T283A, que apresentaram maiores níveis de expressão que NT.

Figura 22 - Análise da Expressão de genes relacionados a síntese da parede celular em plantas da variedade SP80-3280 superexpressando *ShSHN1*. (a) *ShSHN1*; (b) C3H; (c) C4H; (d) F5H; (e) HCT; (f) 4CL; (g) COMT e (h) CAD-A. Plantas NT estão representados por barras vermelhas, eventos superexpressando *ShSHN1* estão representados por barras cinzas. Asteriscos representam dados de expressão significativos.

De posse de todos os dados avaliados, foi possível perceber que o evento T283A apresentou um aumento significativo no nível de expressão do gene COMT, o qual está envolvido na via de biossíntese de lignina na penúltima etapa de síntese da subunidade S (VANHOLME et al., 2010). Tal

fato, pode estar ligado à um aumento da produção da subunidade S e diminuição da subunidade G, refletido na maior razão S/G apresentada no miolo (Figura 21b) e na melhoria da sacarificação também em miolo (Figura 21f).

4.4 Cana energia variedade Vx12-1744

4.4.1 Transformação da Vx12-1744 com *ShSHN1*

A transformação dos *calli* embriogênicos da variedade Vx12-1744 para superexpressão de *ShSHN1* deu-se conforme descrito resumidamente acima e ilustrado na Figura 23.

Figura 23 - Transformação de *calli* embriogênicos e seleção de eventos transformados de cana Vx12-1744 (Vertix 2). A: *calli* embriogênicos transformados com gene *ShSHN1*; B: regeneração em meio seletivo contendo geneticina; C: Eventos transgênicos e plantas controle em fase de aclimação.

Foram obtidos 27 eventos, os quais foram avaliados primeiramente para confirmação dos transgenes, sendo todos positivos para presença do cassete de expressão de *ShSHN*. Em seguida, foi realizada a análise de expressão mostrada na Figura 24.

Os eventos Vx2SHN277, Vx2SHN126, Vx2SHN241 apresentaram os maiores níveis de transcritos de *ShSHN1*, variando de 380 a 670 vezes maior em comparação à expressão média dos controles. Destes, o evento Vx2SHN277 não sobreviveu, o evento Vx2SHN241 apresentou variação somaclonal, enquanto Vx2SHN126 não diferiu fenotipicamente do controle. Os eventos Vx2SHN57, Vx2SHN137 e Vx2SHN295 também apresentaram aumento na expressão de *ShSHN1*, variando de 185 a 260 vezes maiores que a média da expressão dos controles. O evento Vx2SHN154, apesar de positivo

para a presença do gene, não apresentou alteração da expressão de *ShSHN1*. O que também pode estar relacionado ao silenciamento gênico em cana (BIRCH; BOWER; ELLIOTT, 2010).

Figura 24 – Análise de expressão de 27 eventos transgênicos e 3 NT de cana energia variedade Vx12-1744 superexpressando *ShSHN1*.

4.4.2 Análises Biométricas nas plantas *ShSHN1*

Algumas características biométricas como altura, diâmetro e número de colmos podem facilitar a definição da melhor variedade a ser cultivada (OLIVEIRA et al., 2016), por serem medidas indiretas da produtividade, e relacionadas aos componentes de produção. É fato que essas medidas necessitam refletir experimentação a campo em mais de um local. Eventos transformados da variedade Vx12-1744 foram avaliados neste projeto e seus resultados estão descritos a seguir.

Um total de 140 eventos (geração T₁) da variedade Vx2 superexpressando o gene *ShSHN1* foi avaliado a campo, em cana soca, para os parâmetros diâmetro do colmo (em cm), % fibra, tonelada de fibra por hectare (TFH), perfilhamento, tonelada e massa verde por hectare (TMVH) e tonelada de massa seca por hectare (TMSH – dados não mostrados), dos quais dez foram selecionados em cana soca, com resultados descritos na tabela 5.

O parâmetro diâmetro do colmo teve um aumento de até 22%, como verificado no evento Vx2SHN252. Contudo, este aumento não foi observado em todos os eventos avaliados, uma vez que alguns apresentaram diminuição de até 20% (Vx2SHN156) no diâmetro quando comparado as plantas NT.

A porcentagem de fibra apresentou redução de até 21% (Vx2SHN252) quando comparada aos NT, com exceção do evento Vx2SHN318 que apresentou um aumento de 22%. Apesar dessa diminuição de fibras nos colmos, o total de toneladas de fibra por hectare (TFH) aumentou até 80% (Vx2SHN252), o que pode estar relacionado com o aumento de até 137% (Vx2SHN90 e Vx2SHN156) no número de perfilhos por metro. O aumento de 40 a 55% no número de perfilhos também foi observado em arroz superexpressando *ShSHN1*, bem como nos eventos da variedade SP80-3280 superexpressando o mesmo gene, evidenciando que *ShSHN1* pode estar relacionado ao aumento do número de perfilhos (MARTINS et al., 2018).

Os parâmetros tonelada de massa verde por hectare (TMVH) e tonelada de massa seca por hectare (TMSH) também aumentaram para todos os eventos avaliados em até 130% (Vx2SHN252) em TMVH e até 100% (Vx2SHN318) em TMSH.

Tabela 5 - Análises biométricas, em ciclo de cana soca, conduzidos a campo, de eventos transgênicos de cana energia superexpressando *ShSHN1*.

EVENTO	DIÂMETRO	FIBRA	TFH	PERFILHAMENTO	TMVH	TMSH
PLANTAS NT	15,2	20,72	23,98	28	115,72	31,68
VX2SHN252	18,6	16,17	43,15	54	266,91	57,91
VX2SHN251	13,8	17,10	43,00	71	251,43	58,42
VX2SHN224	15,8	19,31	41,79	61	216,39	56,11
VX2SHN90	13,4	18,24	38,49	67	211,02	52,12
VX2SHN215	16,4	20,32	42,65	58	209,88	54,53
VX2SHN57	14,4	20,26	39,74	51	196,14	51,62
VX2SHN156	12,0	19,72	34,40	67	174,44	44,76
VX2SHN40	13,4	18,26	31,26	62	171,21	41,47
VX2SHN318	15,0	25,32	52,02	51	205,46	63,38
VX2SHN239	17,0	19,11	39,25	59	205,31	52,70

Diâmetro (cm): diâmetro do colmo em centímetros; Fibra %: a porcentagem de fibra; Perfilhamento: perfilhamento por metro na linha plantada; TMVH: tonelada de massa verde por hectare; TMSH: tonelada de massa seca por hectare e TFH: toneladas de fibra por hectare.

4.4.3 Análise de parede celular em cana energia superexpressando *ShSHN1*

Dentre as diferentes características que compõe a análise de PC, a proporção dos diferentes compostos e sua composição bioquímica estão entre as mais analisadas (DAVISON et al., 2006). Nesse sentido, eventos transgênicos das variedades SP80-3280 foram avaliados e seus resultados estão descritos a seguir.

Com o objetivo de entender o mecanismo de atuação do *ShSHN1* em cana energia, os componentes de PC foram avaliados em colmo inteiro maduro. Dessa forma, a partir de dados biométricos e de expressão gênica, foram selecionados dez eventos transgênicos elite, incluindo o evento

Vx2SHN252. Houve pouca variação dos componentes de parede em todos os eventos avaliados, como descrito a seguir.

O teor de lignina apresentou aumento de 3% (Vx2SHN40) a 10% (Vx2SHN156) em quatro eventos, enquanto o evento Vx2SHN138 apresentou uma redução de 15% (Figura 25a).

A quantidade de pectina apresentou uma redução de 2% (Vx2SHN138) a 35% (Vx2SHN224), com exceção do evento Vx2SHN215, o qual apresentou aumento de cerca de 63% de pectina comparada as plantas NT (Figura 25b). Diferentemente do observado na SP80-3280, houve correlação entre o aumento de pectina e melhoria da sacarificação (evento Vx2SHN215), corroborando com os dados observados em arroz (MARTINS et al.; 2018).

Já a quantidade de hemicelulose, a maioria dos eventos apresentaram redução, variando de 2% (Vx2SHN40) a 27% (Vx2SHN169), enquanto o evento VxSHN318 apresentou aumento de 10% (Figura 25c). Na análise de celulose, sete eventos mostraram aumento de 2% (Vx2SHN40) a 19% (Vx2SHN138), com uma diminuição de até 13% no conteúdo de celulose para o evento Vx2SHN215 (Figura 25d). Na avaliação da sacarificação (Figura 25e), somente o evento Vx2SHN215 apresentou melhoria de 34%, os demais eventos apresentaram uma piora da sacarificação variando de 4% (Vx2SHN90) a 31% (Vx2SHN169). Esta melhoria da sacarificação no evento Vx2SHN215 pode estar relacionada ao seu aumento de pectina (63%), assim como observado em folhas de arroz superexpressando *ShSHN1* (MARTINS et al., 2018). A razão S/G não foi avaliada nesses eventos visto que não houve melhoria da sacarificação para maior parte dos eventos.

Figura 25 - Análises bioquímicas para a variedade Vx2 superexpressando *ShSHN1*. (a) Quantidade de Lignina, determinada pelo método de Brometo de Acetila, em porcentagem da parede celular; (b) Quantidade de Pectina em mg/g de parede celular; (c) Quantidade de Hemicelulose em mg/g de parede celular; (d) Quantidade de Celulose em mg/g de parede celular; (e) Porcentagem de sacarificação. Plantas NT estão representadas por barras vermelhas, eventos superexpressando *ShSHN1* estão representados em cinza.

É sabido que a cana energia possui diâmetro de colmo estreito (1,5 a 2 cm), e conseqüentemente menor quantidade de miolo na sua composição (<http://www.granbio.com.br/conteudos/cana-energia/>), ao contrário do observado em colmo de cana-de-açúcar (3cm). Diferentemente dos resultados obtidos com a cana de açúcar SP80-3280, os eventos superexpressando *ShSHN1* da cana energia não apresentaram modificações nos componentes de

PC, evidenciando novamente que a superexpressão do *ShSHN1* atua de forma tecido-específica em miolo.

4.5 Perspectivas biotecnológicas para SHN

O FT SHN é considerado um regulador mestre na biossíntese da parede celular de plantas (AMBAVARAM et al., 2011) o que gerou interesse em diversos grupos de estudar esse FT em diversas culturas (Tabela 6). Foi verificado a existência de três genes SHN em *Arabidopsis* (*AtSHN1*, *AtSHN2* e *AtSHN3*). Tais genes apresentam relação com diferentes funções e sua expressão foi observada em diferentes idades e partes da planta: plantas superexpressando *AtSHN1* apresentaram maior tolerância a seca; o gene *AtSHN2* está envolvido com órgãos florais e é pouco expresso em folhas; e o gene *AtSHN3* é expresso constitutivamente em toda a planta (AHARONI et al., 2004).

As diferenças nas funções de SHN foram principalmente observadas entre dicotiledôneas e monocotiledôneas (Tabela 6). Em dicotiledôneas, foram encontrados dois ortólogos de *AtSHN1*, denominados *EgSHN1a* e *EgSHN1b*, sendo que *EgSHN1* com maior expressão em flores, sugerindo uma função similar a *AtSHN1* (MARQUES et al., 2011). O silenciamento de *SISHN3* em tomate resultou em alterações morfológicas na epiderme do fruto e redução significativa dos lipídios cuticulares (SHI et al., 2013), além de afetar a cutícula da folha do tomate, resultando em folhas brilhantes, atrofiadas e permeáveis, com aumento de cutina com *SISHN3* superexpresso (BUXDORF et al., 2014). Pela primeira vez foi demonstrado que a superexpressão de *SHN* resultou em resistência à infecção pelos patógenos *B. cinerea* e a *X. campestris* (BUXDORF et al., 2014). A expressão de *TaSHN1* em *Arabidopsis* resultou em superfícies foliares brilhantes, diminuição moderada do número total de estômatos e a superproliferação de material cuticular, observada por microscopia eletrônica (JÄGER et al., 2015). As plantas de *Arabidopsis* superexpressando *TaSHN1* não apresentaram diferenças às NTs em relação a tolerância a seca.

Um mapeamento de quantitative trait locus (QTL) em uma população de macieiras identificou que o gene MdSHN3 tem menor expressão em linhagens com formação inadequada de cutícula, sugerindo que seja um regulador fundamental da biossíntese de cutícula em frutos de maçã (LASHBROOKE et al., 2015).

Em soja, foram identificados 10 homólogos de SHN, os quais, assim como para *Arabidopsis*, também apresentavam diferentes estruturas gênicas e padrões de expressão de órgãos, apresentando diferentes fenótipos foliares e diferentes níveis de brilho nas superfícies foliares com diferentes expressões constitutivas dos genes. Já a superexpressão de *GmSHN1* e *GmSHN9* em *Arabidopsis* exibiu aumento de cera na cutícula da folha e no conteúdo total de cutina das folhas. Além disso, foi observada a alteração da ultraestrutura da membrana da cutícula da folha e aumento da taxa de perda de água em plantas transgênicas de *Arabidopsis*. Os níveis de expressão de genes relacionados à biossíntese de cera e cutina e ao desenvolvimento de folhas foram também alterados (XU et al., 2016).

Em monocotiledôneas, primeiramente foi estudado o gene NUD, que apresentou homologia com o FT WIN1/SHN1 de *Arabidopsis* (TAKETA et al., 2008). Tal gene é responsável pelo controle do fenótipo de cariopse vestida (gene expresso e produção de camada lipídica na superfície da cariopse) ou nua (gene não expresso). De modo diferente ao observado nos genes SHN de outras espécies, não foi detectada a expressão de NUD em outros tecidos avaliados, como folhas e casca.

A superexpressão de *AtSHN1* em arroz, um modelo de gramíneas, causou aumento de 34% de celulose, redução de 45% no teor de lignina e composição alterada de lignina correlacionada com melhor digestibilidade (AMBAVARAM et al., 2011). Ambavaram et al. (2011) também observaram que SHN coordena a regulação negativa da biossíntese de lignina e a regulação positiva da celulose e outros genes da via de biossíntese da PC, afirmando que o desenvolvimento de culturas com aumento de celulose e baixo teor de lignina podem melhorar a viabilidade da utilização produção de biocombustíveis.

Em arroz, a avaliação do gene *OsWR1* mostrou que este é um modulador da síntese de cera, assim como observado também em dicotiledôneas, sendo induzido por seca, ácido abscísico e sal. A sua expressão ocorre principalmente em folhas, de maneira que quanto maior sua expressão, maior sua tolerância à seca, estando está relacionada as características cuticulares (WANG et al., 2012).

Para switchgrass, a superexpressão de um dos genes ERF (*PvERF001*), homólogo de *AtSHN2* e *OsSHN*, foi associada ao aumento do rendimento de biomassa e eficiência de liberação de açúcar, sem estar diretamente envolvido na regulação da PC (WUDDINEH et al., 2015). As plantas superexpressando *PvERF001* não apresentaram mudanças significativas na composição e no conteúdo de lignina. Além disso, foi observado um aumento significativo na estatura das plantas, sem haver aumento na quantidade de perfilhos, ao contrário do observado em arroz superexpressando *OsWR2*, o qual apresentou aumento no perfilhamento, sem aumento de estatura (ZHOU et al., 2014), o que pode estar relacionado a uma divergência funcional gênica durante sua duplicação (WUDDINEH et al., 2015).

SHN foi ainda estudado em trigo, através da superexpressão de um SHN de trigo em trigo. As linhagens transgênicas apresentaram maior quantidade de estômatos, perda de água foliar significativamente menores e melhor recuperação após seca severa, em comparação com as NT. Uma das linhagens apresentou altura superior, maior número de sementes por espiga (características envolvendo biomassa) e floração atrasada em relação aos NT (BI et al., 2018). Os genes envolvidos com biossíntese da cutícula, assim como em *Arabidopsis* superexpressando *GmSHN*, também foram alterados (DJEMAL; KHOUDI, 2016).

As orquídeas também possuem um representante SHN (*PeERF1*), expresso apenas no estágio 5 em pétala específica da flor, quando as flores se abrem, coincidindo com o espessamento da cutícula (LAI et al., 2020). Além disso, a superexpressão heteróloga de *PeERF1* em *Arabidopsis* produziu folhas brilhantes na superfície adaxial (LAI et al., 2020).

Tabela 6 – Diferentes fenótipos apresentados em diferentes organismos e suas diferentes abordagens

Gene	Técnica	Organismo (*)	Fenótipo e Via Metabólica envolvida	Referência
<i>AtSHN</i>	Superexpressão	Arabidopsis (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(AHARONI et al., 2004; Shi et al., 2011; KANNANGARA et al., 2007; BROUN et al., 2004)
<i>EgSHN1a</i> e <i>EgSHN1b</i>		Eucalipto (di)		(MARQUES et al., 2011)
<i>SISHN</i>	Superexpressão Silenciamento	Tomate (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(SHI et al., 2012; AI-ABDALLAT et al., 2014; BUXDORF et al., 2014)
<i>TaSHN</i>	Superexpressão	Arabidopsis (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(JÄGER et al., 2015)
<i>MdSHN3</i>	QTL*	Maçã (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(LASHBROOKE et al., 2015)
<i>GmSHN1/</i> <i>GmSHN9</i>	Superexpressão	Arabidopsis (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(XU et al., 2016)
<i>HvSHN1</i>	Superexpressão	Planta do fumo (di)	Plantas mais tolerantes a sal, estresse osmótico e por calor. Alteração na permeabilidade da cutícula e menor densidade de estômatos.	(DJEMAL; KHOUD, 2021a)
<i>TdSHN1</i>	Superexpressão	Planta do fumo	Plantas mais tolerantes a metais	(DJEMAL; KHOUD, 2021b)

			pesados (cádmio, cobre e zinco) e melhor acúmulo de biomassa	
<i>NUD</i>	Superexpressão	Cevada (mo)	Mudanças na deposição lipídica do pericarpo	(TAKETA et al., 2008)
<i>AtSHN2</i>	Superexpressão	Arroz (mo)	Aumento de celulose e Diminuição de Lignina	(AMBAVARAM et al., 2011)
<i>OsWR1</i> e <i>OsWR2</i>	Superexpressão	Arroz (mo)	Biossíntese de Cera e Cutina, Plantas mais tolerantes ao estresse hídrico	(WANG et al., 2012; ZHOU et al., 2014)
<i>PvERF001</i>	Superexpressão	<i>Switchgrass</i> (mo)	Aumento de biomassa sem alteração de Lignina	(WUDDINEH et al., 2015)
<i>HvSHN1</i>		<i>Cevada</i> (mo)	Expressão induzida por estresse salino, frio, calor e seca.	(DJEMAL et al., 2016)
<i>TaSHN1</i>	Superexpressão	Trigo (mo)	Tolerância múltipla ao estresse abiótico	(DJEMAL; KHOUD, 2016)
<i>ShSHN</i>	Superexpressão	Arroz (mo)	Aumento de biomassa e Lignina	(MARTINS, 2017; MARTINS et al., 2018)
<i>TaSHN</i>	Superexpressão	Trigo (mo)	Modificações na superfície da folha e melhora a tolerância à seca	(BI et al., 2018)
<i>PeERF1</i>	Silenciamento e Superexpressão	<i>Phalaenopsis</i> (mo) e <i>Arabidopsis</i> (di)	Formação morfológica das células epidérmicas na floração de orquídeas. Biossíntese de cera	(LAI et al., 2020)

			e cutina em		
			<i>Arabidopsis</i>		
<i>ShSHN1</i>	Superexpressão	Cana-de-açúcar e Cana Energia	Aumento de biomassa e melhoria da sacarificação	Dados deste trabalho	(Tabela 7)

A superexpressão de *ShSHN1* em cana-de-açúcar e cana energia apresentou resultados semelhantes à superexpressão de *ShSHN1* em arroz (Tabela 7). Em arroz foi possível observar um aumento na biomassa, pectina, conteúdo de celulose e maior eficiência de sacarificação, bem como uma redução no conteúdo e alteração da composição de lignina.

Os dados aqui obtidos revelaram que *ShSHN1* atua de forma tecido-específica em miolo da cana, alterando mais efetivamente a quantidade do que composição da PC neste tecido. Diferentemente em casca, a alteração na composição da PC é mais evidente. Isto reflete em resultados mais expressivos em cana-de-açúcar do que em cana energia (Tabela 7), a qual possui colmos de diâmetro mais estreito que a cana-de-açúcar, com consequente menor quantidade de miolo.

Tabela 7 - Resumo das quantificações da parede celular com superexpressão de *ShSHN1* em cana-de-açúcar (SP80-3280) e cana energia (VX12-1744)

	SP80-3280 (FOLHA)	SP80-3280 (CASCA)	SP80-3280 (MIOLO)	VX12-1744
PECTINA	*	-20 a -53%	-64% a +59%	-35 a +63%
CELULOSE	*	-17 a +98%	-63 a +59%	-13 a +19%
HEMICELULOSE	*	-52% a +64%	-66% a +58%	-22 a +6%
LIGNINA	-68% a +5%	-15% a +21%	-47% a +5%	-15 a +10%
RAZÃO S/G	+4 a +71%	-29% a +40%	-14% a +24%	*
SACARIFICAÇÃO	*	-64 a +159%	-66% a +466%	+34%

*Dados não avaliados

Os diferentes fenótipos apresentados por diferentes culturas, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, demonstram que *SHN* possui possivelmente diferentes mecanismos de ação em diferentes tecidos e idades de diferentes organismos, estando intimamente relacionado com a biossíntese de componentes da PC. Ainda mais estudos devem ser realizados em

diferentes culturas para maior entendimento deste FT que possui grande potencial para melhoria da matéria-prima para produção de E2G.

Os estudos realizados até agora por nosso grupo de pesquisa resultaram em um pedido de patente de invenção (BR 10 2018 070416 8) intitulado: “Cassete de superexpressão do gene SHINE para produção de plantas com aumento de biomassa e alteração da mesma, seus usos e métodos”. Mais avanços no entendimento do funcionamento de *ShSHN1* serão realizados por nosso grupo, como sequenciamento global de RNA (RNA-Seq), para determinação de parceiros de interação desse FT em cana-de-açúcar e cana energia.

5. CONCLUSÕES

O vetor pOESHN de superexpressão do FT SHN1 de cana-de-açúcar (pJFNPTII::ShSHN1) foi obtido e inserido em *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação.

Os eventos de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 superexpressando ShSHN1 obtidos apresentaram variabilidade para os caracteres biométricos número de perfilhos, número de gemas, bem como para os parâmetros bioquímicos: celulose, hemicelulose, lignina e pectina.

Foi possível selecionar eventos transgênicos superiores em relação às plantas controles, quanto aos parâmetros biométricos e bioquímicos.

A análise bioquímica revelou que o teor de lignina variou entre casca e miolo, embora não tenha sido observado um padrão de aumento/diminuição deste componente nos dois tecidos avaliados. O mesmo foi observado para a razão S/G, e teores de celulose, hemicelulose e pectina.

Houve uma melhora da sacarificação em até 465% no miolo e até 151% em casca.

Os eventos de cana energia variedade Vx12-1744 superexpressando ShSHN1 obtidos apresentaram variabilidade para diâmetro do colmo (em cm), % fibra, tonelada de fibra por hectare (TFH), perfilhamento, tonelada e massa verde por hectare (TMVH) e tonelada de massa seca por hectare (TMSH).

A análise bioquímica também revelou variação no teor de lignina, para a razão S/G, e teores de celulose, hemicelulose, pectina e sacarificação. O evento Vx2SHN215 foi o único que apresentou melhoria na sacarificação (34%), o que pode estar relacionado ao seu aumento de pectina (63%), assim como observado em plantas de arroz superexpressando ShSHN1.

Até o presente momento foi possível concluir que o FT SHN é realmente um regulador mestre da deposição de componentes da PC, estando envolvido na síntese de lignina, celulose, pectina e hemicelulose em diferentes tecidos de cana-de-açúcar de forma tecido-específica. Foi ainda possível verificar que o FT SHN parece regular os diferentes componentes da PC de maneira espécie-

específica com base nos achados aqui e trabalhos anteriores, evidenciando a importância de se validar um gene em seu modelo de estudo.

Os eventos aqui obtidos estão sendo avaliados em experimentação a campo, havendo expectativa de que eles representem, num futuro próximo, pedidos de liberação comercial.

6. PERSPECTIVAS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os melhores eventos de cana-de-açúcar superexpressando *ShSHN1* foram levados para experimento a campo, em parceria com a empresa Granbio. Tais eventos serão avaliados com repetição e sofrendo impactos do ambiente em seus genótipos, o que poderá impactar em fenótipos diferentes dos apresentados nos experimentos em casa-de-vegetação.

Os eventos de cana energia *vertex2* (Vx12-1744) superexpressando *ShSHN1* também seguem em experimentação a campo para melhor conhecimento dos fenótipos gerados e de sua estabilidade.

Juntamente com os dados aqui obtidos e após coleta de dados em campo, espera-se poder selecionar o melhor evento para realização de um sequenciamento global de RNA (RNASeq) a fim de poder determinar alguns genes alvos de *ShSHN1* em cana-de-açúcar e cana energia. Além disso, é interessante a busca por mais conhecimento sobre promotores de *SHN*.

Durante o projeto foi verificado que as plantas de SP80-3280 superexpressando *ShSHN1* apresentava maior infestação por lagartas do que as NT, havendo tentativas de experimentos para verificar tal fato. Contudo, devido a questões de infraestrutura, as lagartas morriam antes do final do experimento, devido ao calor excessivo causado pelas lâmpadas da estufa utilizada. Dessa forma, no futuro, seria interessante o teste de infestação de lagartas nos eventos transformados e NT.

Além disso, foi verificado que plantas de Vx12-1744 superexpressando *ShSHN1* apresentaram menos flores do que as NT (dados não coletados). Uma vez que após a floração a cana praticamente não cresce mais no sentido do seu comprimento e passa a perder peso e quantidade de açúcar, esta não é desejada na cultura. Desse modo, sugere-se maiores estudos da interação de *ShSHN1* com genes de floração, uma vez que como relatado por Aharoni et al. (2004) *SHN* está relacionado à flor de plantas.

Ao final de todo o projeto, espera-se contribuir com um maior entendimento do funcionamento gênico da PC de monocotiledôneas.

7. REFERÊNCIAS

- ABDALA, T. O. **Análise comparativa dos processos de produção de etanol anidro**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – UFU. Uberlândia, p. 42, 2017.
- ACHYUTHAN, K. E. et al. Supramolecular Self-Assembled Chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641-8688, 29 nov. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15118641>.
- AGARWAL, U. P. et al. Estimation of Syringyl Units in Wood Lignins by FT-Raman Spectroscopy. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 67, n. 15, p. 4367-4374, 2019. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06707>.
- AHARONI, A. et al. The SHINE Clade of AP2 Domain Transcription Factors Activates Wax Biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and Confers Drought Tolerance when Overexpressed in Arabidopsis. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.2463-2480, 19 ago. 2004. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.022897>.
- ALTPETER, F.; XU, J.; AHMED; S. Generation of large numbers of independently transformed fertile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Plants of Forage- and turf-type cultivars. **Mol. Breed.** 6,p. 519–528, 2000.
- AMBAVARAM, M. M. R. et al. Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 155, n. 2, p.916-931, 2011. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.168641>.
- ARENCIBIA, A. et al. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 99-109, 1998.
- ARNI, Saleh Al. Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: a review. **Industrial Crops And Products**, v. 115, p. 330-339, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.012>.
- BANSAL, A. et al. Energy efficiency of ethanol production from cellulosic feedstock. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p.141-146, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.122>.
- BARRIÈRE, Y. et al. Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as model species. **Genes Genomes Genomics**, v. 1, p. 133–156, 2007.
- BATISTA, T. R. **Transformação genética de cana de açúcar e validação de genes de referência para avaliação de número de cópias inseridas por PCR em tempo real**. 2016. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2016.
- BIRCH, R. G.; BOWER, R. S.; ELLIOTT, A. R. Highly efficient, 5'-sequence-specific transgene silencing in a complex polyploid. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p.88-97, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-010-9047-0>.

BOMBLE, Y. J. et al. Lignocellulose deconstruction in the biosphere. **Current Opinion In Chemical Biology**, v. 41, p.61-70, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.013>.

BOTTCHER, A. et al. Lignification in Sugarcane: Biochemical Characterization, Gene Discovery, and Expression Analysis in Two Genotypes Contrasting for Lignin Content. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1539–1557, 2017. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225250>.

BOUHLEL, M. A.; LAMBERT, M.; DAVID-CORDONNIER, M. H. Targeting Transcription Factor Binding to DNA by Competing with DNA Binders as an Approach for Controlling Gene Expression. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 14, p. 1323-1358, 2015. doi: 10.2174/1568026615666150413154713.

BOUT, S. VERMERRIS, W. A candidate-gene approach to clone the sorghum *Brown midrib* gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. **Mol Genet Genomv**. 269, p.205–214, 2003.

BRITO, M. S. et al. Expression Profile of Sugarcane Transcription Factor Genes Involved in Lignin Biosynthesis. **Tropical Plant Biology**, v. 8, n. 1-2, p.19-30, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-015-9147-y>.

BROWN L.; TORGET; R. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, chemical analysis and testing task laboratory analytical procedures (LAP 009). NREL Biomass Program, 1996.

BUXDORF, K. et al. The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants. **Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 84, n. 1-2, p. 37-47, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-013-0117-1>.

CANNELLA, D.; SVEDING, P. K.; JØRGENSEN, H. PEI detoxification of pretreated spruce for high solids ethanol fermentation, **Applied Energy**, v. 132, p. 394-403, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.07.038>.

CARVALHO-NETTO, O. V. et al. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chem. Biol. Technol. Agric.**, v. 1, n. 20, 2014. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0020-2>.

CASSAN-WANG, H. et al. Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis. **Frontiers In Plant Science**, v. 4, n. 189, 2013. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00189>.

CESARINO, I. et al. An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. **Brazilian Journal Of Botany**, v. 35, n. 4, p. 303-311, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-84042012000400003>.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 7, p.759-761, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1316>.

CHINELATO, P. H. **Produtividade e comportamento biométrico da cana-de-açúcar sob aplicação de vinhaça (in natura) e adubação mineral via gotejamento subsuperficial**. 2016. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2016.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Cana-de-açúcar, Safra 2020/2021, Quarto Levantamento, Maio de 2021.

- COOPER, G.M. **The cell**. 2^o. ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- CRESTE, S. et al. A biotecnologia como ferramenta para o melhoramento genético. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. Cap. 6. p. 157-176.
- DAL-BIANCO, M. et al. Sugarcane improvement: how far can we go?. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 23, n. 2, p.265-270, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.002>.
- DAVISON, B. H. et al. Variation of S/G ratio and lignin content in a populus family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 130, n. 1-3, p.427-435, 2006. <http://dx.doi.org/10.1385/abab:130:1:427>.
- DJEMAL, R.; KHOUDI, H. TdSHN1, a WIN1/SHN1-type transcription factor, imparts multiple abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. **Environmental And Experimental Botany**, v. 131, p.89-100, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.07.005>.
- DJEMAL, R. et al. Molecular cloning and characterization of novel WIN1/SHN1 ethylene responsive transcription factor HvSHN1 in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal Of Plant Physiology**, v. 228, p.39-46, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.019>.
- DJEMAL, R.; KHOUDI, H.. The barley SHN1-type transcription factor HvSHN1 imparts heat, drought and salt tolerances in transgenic tobacco. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 164, p. 44-53, 2021a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.018>.
- DJEMAL, R.; KHOUDI, H. The ethylene-responsive transcription factor of durum wheat, TdSHN1, confers cadmium, copper, and zinc tolerance to yeast and transgenic tobacco plants. **Protoplasma**, 13 p., 2021b. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-021-01635-z>.
- DRAUDE, K. M.; KURNIAWAN, C. B.; DUFF, S. J. B. Effect of oxygen delignification on the rate and extend of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, v. 79, p.113-120, 2001.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- EDWARDS, M. C.; DORAN-PETERSON, J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, n. 3, p. 565-75, 2012. doi: 10.1007/s00253-012-4173-2.
- FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54).
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood-chemistry, ultrastructure, reactions**. 1^o. ed. New York : Walter de Gruyter, 1989.
- FERRER, J. L. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 356-370, 2008.

FIGUEIRA, T. R. et al. A BAC library of the SP80-3280 sugarcane variety (*saccharum* sp.) and its inferred microsynteny with the sorghum genome. **Bmc Research Notes**, v. 5, n. 1, p.185-196, 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-5-185>.

FIGUEIREDO, P. Breve História da Cana-de-Açúcar e do Papel do Instituto agrônômico no seu Estabelecimento no brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. de A.. **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. Cap. 1. p. 31-44.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>

GRAY, J.; CAPARROS-RUIZ, D.; GROTEWOLD, E. Grass phenylpropanoids: Regulate before using! **Plant Science**, v. 184, p.112-120, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.008>.

GUI, J.; SHEN, J.; LI, L. Functional characterization of evolutionarily divergent 4-coumarate: Coenzyme A ligases in rice. **Plant Physiology**, v. 157, p.574–586, 2011.

GUO, D. M.; RAN, J. H.; WANG, X. Q. Evolution of the Cinnamyl/Sinapyl Alcohol Dehydrogenase (CAD/SAD) Gene Family: The Emergence of Real Lignin is Associated with the Origin of Bona Fide CAD. **J Mol Evol**, v. 71, p. 202–218, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00239-010-9378-3>

HE, Y. et al. Lignin composition is more important than content for maize stem cell wall degradation. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 98, n. 1, p.384-390, 25 set. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8630>.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p.804-807, 2007. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137016>.

HOANG, N. V. et al. Association of gene expression with biomass content and composition in sugarcane. **Plos One**, v. 12, n. 8, p.1-31, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183417>.

HUANG, J. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. **Plant Physiol**, v. 153, p. 1526–1538, 2010.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2-3, p. 185-202, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.023>.

ISKANDAR, H. et al. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 325-337, 2004. [10.1007/BF02772676](https://doi.org/10.1007/BF02772676).

JACKSON, L. A. et al. Improving saccharification efficiency of alfalfa stems through modification of the terminal stages of monolignol biosynthesis. **BioEnergy Res**, v. 1, n. 3-4, p. 180–192, 2008.

JÄGER, K. et al. Expression of a WIN/SHN-type regulator from wheat triggers disorganized proliferation in the *Arabidopsis* leaf cuticle. **Biologia Plantarum**,

[s.l.], v. 59, n. 1, p.29-36, 7 nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-014-0471-0>.

JOHNSON, D. B.; MOORE, W. E.; ZANK, L. C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **Tappi**, v. 44, p 793–798, 1961.

KIYOTA, E.; MAZZAFERA, P.; SAWAYA, A. C. H. F.. Analysis of Soluble Lignin in Sugarcane by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with a Do-It-Yourself Oligomer Database. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 84, n. 16, p.7015-7020, 8 ago. 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/ac301112y>.

KOHLI, A. et al. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. **Planta**, v. 208, p. 88-97, 1999.

KOHLI, A. et al. The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, p.185-195, 2006.

LAGAERT, S.; BELIËN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p.1064–1073, 2009.

LAI, P. et al. PeERF1, a SHINE-Like Transcription Factor, Is Involved in Nanoridge Development on Lip Epidermis of Phalaenopsis Flowers. **Frontiers In Plant Science**, v. 101, n. 1, 19 p., 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01709>.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. **4º Treinamento PROCANA - Conceitos e critérios para avaliação experimental em cana-de-açúcar utilizados no Programa Cana IAC. Jaú, SP.: Centro de Cana-de-Açúcar - IAC. 2000. Boletim Técnico.**

LANDELL, M. G. A. et al. Sistema de multiplicação de muda de cana de açúcar com o uso de mudas pré-brotadas (MPB) oriundas de gemas individualizadas. IAC – Instituto Agrônomo de Campinas, 2013. Documento 109.

LARSEN, J. et al. The IBUS Process: Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. **Chemical Engineering & Technology, Weinheim**, v. 31, n. 5, p. 765–772, 2008.

LEMOES, C.. **Cana de 3 dígitos: a busca pela produtividade e longevidade dos canaviais.** 2016. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/conteudo/cana-de3-digitos-a-busca-pela-produtividade-e-longevidade-dos-canaviais.html>>. Acesso em: 01 jun. 19.

LI, X. et al. *FLEXIBLE CULM 1* encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. **Plant Mol Biol**, v.69, p.685–697, 2009.

LI, M.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance. **Front Chem.**, v. 18, p. 4-45, 2016. doi: 10.3389/fchem.2016.00045.

LICAUSI, F.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress

responses and developmental programs. **New Phytologist**, v. 199, n. 3, p. 639-649, 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12291>.

LIU, Y. et al. Functional characterization of populus psnshn2 in coordinated regulation of secondary wall components in tobacco. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.678-689, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00093-z>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LLERENA, J. P. P. et al. Deposition of lignin in four species of Saccharum. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42350-3>.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 32, n. 7, p.582-595, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.12.006>.

MALÇA, J.; FREIRE, F. Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bio-ethyl tertiary butyl ether (bioETBE): Assessing the implications of allocation. **Energy**, [s.l.], v. 31, n. 15, p.3362-3380, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2006.03.013>.

MANISHA, S. K. Y. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 245, p.1727-1739, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.066>.

MARQUES, W. L. et al. Exploring a new model of cell wall regulation: identification and expression of two putative shines transcription factors in eucalyptus. **Bmc Proceedings**, [S.L.], v. 5, n. 7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-5-s7-p166>.

MARTINS, A. P. B. et al. Ectopic expression of sugarcane SHINE changes cell wall and improves biomass in rice. **Biomass And Bioenergy**, v. 119, p.322-334, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.036>.

MATTIELLO, L. et al. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. **Bmc Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-015-0694-z>.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 37-46, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00118-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00118-3).

MOKOCHINSKI, J. et al. A simple protocol to determine lignin S/G ratio in plants by UHPLC-MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 23, p. 7221-7221, 2015. [10.1007/s00216-015-8886-9](http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8886-9).

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da Lignificação de Células Xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, v. 11, p.48-57, 2004.

MORO, M. K. **PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EXTRUSÃO COM DUPLA-ROSCA**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado) -

Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAKANO, T. et al. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 411–432, 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073783>.

NOOKARAJU, A. et al. Designing Cell Walls for Improved Bioenergy Production. **Molecular Plant**, v. 6, n. 1, p. 8-10, 2013.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

OLIVEIRA, A. R. et al. Análise biométrica de cultivares de cana-de-açúcar cultivadas sob estresse hídrico no vale do submédio são francisco. **Energia na Agricultura**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.48-69, 20 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.17224/energagric.2016v31n1p48-58>.

OOKAWA, T. et al. Increased lodging resistance in long-culm, low-lignin *gh2*rice for improved feed and bioenergy production. **Science Report**, v.4, p.6567, 2014.

PAES, L. A. F.; OLIVEIRA, M. A. Potential trash biomass of the sugar cane plant in Biomass Power Generation. **Sugarcane Bagasse and Trash**, S. J. Hassuani, M. L. R. V. Leal, and I. C. Macedo, Eds., p. 19, PNUD and CTC, Piracicaba, Brazil, 1st edition, 2005.

PEI, Y. et al. G-lignin and hemicellulosic monosaccharides distinctively affect biomass digestibility in rapeseed. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 325-333, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.072>.

POMPIDOR, N. et al. Three founding ancestral genomes involved in the origin of sugarcane. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 127, n. 6, p. 827-840, 26 fev. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcab008>.

POPPE, M. K.; CORTEZ, L. B. Sustainability of sugarcane bioenergy. 1 ed., Center for Strategic Studies and Management (CGEE), Brasília, Brazil, Corporate Financial Center, 2012.

RAÍZEN: Relatório de sustentabilidade 2013/14, São Paulo, Brasil.

RIAÑO-PACHÓN, D. M.; MATTIELLO, L. Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280. **F1000research**, [s.l.], v. 6, p.861-867, 2017. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.11859.1>.

RIECHMANN, J. L. et al. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. **Science**, [s.l.], v. 290, n. 5499, p.2105-2110, 15 dez. 2000. <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5499.2105>.

ROHDE, A. et al. Molecular phenotyping of the *pa/1* and *pa/2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid,

amino acid, and carbohydrate metabolism. **Plant Cell**, v. 16, p. 2749–2771, 2004.

RUSHTON, P. J. et al. TOBFAC: the database of tobacco transcription factors. **Bmc Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p.53-60, 2008. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-53>.

SABALLOS, A. et al. *Brown midrib2 (Bmr2)* encodes the major 4-coumarate: Coenzyme A ligase involved in lignin biosynthesis in sorghum. **Plant Journal**, v.70, p.813–830, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning 2nd ed. Estados Unidos. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SCHILLMILLER, A. L. et al. Mutations in the *cinnamate 4-hydroxylase* gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. **Plant J**, v. 60, p.771–782, 2009.

SHI, J. X. et al. SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. *Plos Genetics*, [S.L.], v. 7, n. 5, 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001388>.

SHI, J. X. et al. The tomato S I SHINE 3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. **New Phytologist**, [S.L.], v. 197, n. 2, p. 468-480, 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12032>.

SOUZA, A. P. de et al. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.564-579, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAKETA, S. ET AL. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 4062-4067, 2008. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711034105>.

TAMAGNONE, L. et al. The *AmMYB308* and *AmMYB330* Transcription Factors from *Antirrhinum* Regulate Phenylpropanoid and Lignin Biosynthesis in Transgenic Tobacco. **The Plant Cell**, v. 10, p.135-154, 1998.

TAVARES, S. R. L.; SANTOS, T. E. Uso de diferentes fontes de biomassa vegetal para produção de biocombustíveis sólidos. **Holos**, v. 5, p.19-27, 2013.

TEW, T. L.; COBILL, R. M. () Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum spp.*) as na energy crop. In: Vermerris W (ed) Genetic Improvement of Bioenergy Crops. **Springer**, New York, pp 249-271, 2008.

UDVARDI, M. K. et al. Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p.538-549, 2007.

UNICA. **Relatório anual 2018/19**. São Paulo, 2019.

- VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.155119>.
- VIGNOLS, F. et al. The *brown midrib3 (bm3)* mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. **Plant Cell**, v.7, p.407–416, 1995.
- WANG, H. Z.; DIXON, R. A. On-off Switches for Secondary Cell Wall Biosynthesis. **Molecular Plant**, v.5, p.297–303, 2012.
- WANG, M. et al. A. Well-to wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. **Environ Res . Lett.**, v. 7, n. 4, p. 045905, 2012.
- WEI, H. et al. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal Of Plant Physiology**, v. 160, n. 10, p.1241-1251, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-01086>.
- WILDHAGEN, H. et al. Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*†. **Tree Physiology**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.320-339, 2017. <http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpx054>.
- WUDDINEH, W. A. et al. Identification and molecular characterization of the switchgrass ap2/erf transcription factor superfamily, and overexpression of pverf001 for improvement of biomass characteristics for biofuel. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [s.l.], v. 3, p.321-342, 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2015.00101>.
- XU, B. et al. Silencing of 4-coumarate: Coenzyme A ligase in switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production. **New Phytology**, v.192, p.611–625, 2011.
- XU, Y. et al. Overexpression of the transcription factors gmsn1 and gmsn9 differentially regulates wax and cutin biosynthesis, alters cuticle properties, and changes leaf phenotypes in arabidopsis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.587-609, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17040587>.
- YANG, F. et al. Engineering secondary cell wall deposition in plants. **Plant Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.325-335, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12016>.
- ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 66, p.751-774, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.
- ZAFALON, M.; FREITAS, T. **Em busca de produtividade, setor aposta em cana transgênica**. 2015. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/cana/em-busca-produtividade-aposta-cana-transgenica-060715>>. Acesso em: 01 jun. 2019.
- ZHANG; B. A missense mutation in the transmembrane domain of CESA4 affects protein abundance in the plasma membrane and results in abnormal cell wall biosynthesis in rice. **Plant Mol Biol**, v.71, p.509–524, 2009.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 6, n. 4, p.465-482, 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1331>.

ZHENG, Y. et al. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p.2459-2465, 2009.

ZHONG, R.; YE, Z. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. **Plant Science**, v. 229, p.193-207, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.009>.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

APÊNDICE A - Manuscrito para submissão em revista científica da área

Overexpression of *ShSHN1* in sugarcane alters cell wall composition resulting in better saccharification efficiency for lignocellulosic ethanol production

Authors:

Natália Gonçalves Takahashi^{a,b}, Alexandre Palma Boer Martins^a, Juan Pablo Portilla Llerena^c, Paulo Henrique da Silva Santos^{a,d}, Larissa Mara de Andrade^a, Greice Lubini^a, Rafael Fávero Peixoto-Júnior^a, Paulo Mazzafera^{c,e}, Paula Macedo Nobile^c, Silvana Creste^{a,b,c,#}, Michael dos Santos Brito^{f,#}

^a-Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto, SP – Brazil

^b-Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP – Brazil

^c-Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP – Brazil.

^d-Departamento de Melhoramento Genético, UNESP- Jaboticabal, SP – Brazil

^e-Departamento de Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP – Brazil

^f-Institute of Science and Technology Federal University of São Paulo – ICT/UNIFESP, São José dos Campos, SP – Brazil 12231-280

Corresponding authors

Michael dos Santos Brito

Email: msbrito@unifesp.br

Institute of Science and Technology - ICT

Federal University of São Paulo - UNIFESP

330 Talim Street - Vila Nair

ZIP Code 12231-280 - São José dos Campos - SP – Brazil

Phone: +55 12 3924-9500 - extension number 9795

Silvana Creste

Address: Centro de Cana – IAC, Rodovia Antônio Duarte Nogueira, Km 321, CEP-14032-800, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Phone: +55-16-

Email: silvanacreste@gmail.com

Abbreviations:

2G – Second generation

CW – Cell wall

SCW – Secondary cell wall

SHN – SHINE

ShSHN – SHINE from sugarcane

T0 - generation zero plants

T1 – plants sprouted after first cut

TF – Transcription Factor

WT – control plants

Abstract

Sugarcane bioethanol represents an alternative energy source to fossil fuels, as it is renewable, sustainable and efficient. Lignocellulosic biomass is one of the raw materials used for the production of second generation ethanol (E2G), however the lignin component hinders the access of enzymes to the substrate (cellulose and hemicellulose) generating low sugar yields in the enzymatic hydrolysis. To get around this obstacle, it becomes necessary to modulate the expression of genes involved in the lignin biosynthesis pathway, such as the use of transcription factors (TFs) to “engineer” plants in order to produce desired compounds and improve an industrial process. Among them, there is the FT SHINE that showed participation in different metabolic routes. Based on the results previously obtained in rice by our group, this work aimed to verify the effects caused in the genetic modification of sugarcane and energy cane overexpressing the same *ShSHN1* in parameters related to improvement in E2G production and consequent increase in ethanol productivity. A total of 200

transgenic events were obtained from sugarcane of the SP80-3280 variety overexpressing *ShSHN1*. The transformed events showed an increase in the expression level of the *ShSHN1* gene up to 12 times higher compared to the endogenous expression level. There was an increase of up to 310% in dry mass, 130% more in the number of tillers and 120% more buds per pot when compared to non-transformed plants. Furthermore, in leaves, a decrease of up to 68% of lignin and an increase in the S/G ratio of up to 71% was observed. In the evaluation of these parameters in part of the culm (entrenode 8) there was a lignin variation from minus 15% to plus 21% of lignin in bark and from minus 47% to plus 5% in crumb. The pectin was reduced by up to 53% in the internode 8 bark, while in the kernel the variation was from minus 64% to plus 59% pectin in the transformed events. The cellulose ranged from minus 17% to plus 98% in bark and from minus 63% to plus 59% in crumb. As for the hemicellulose parameter, the variation was from minus 52% to plus 64% for bark and minus 66% to plus 58% in crumb. Modification of these parameters resulted in improvements in saccharification of up to 159% in bark and up to 466% in crumb. The overexpression of *ShSHN1* in sugarcane energy variety Vx12-1744 resulted in variations in the evaluation of these parameters in stalk. Lignin ranged from a 15% decrease to a 10% increase. Pectin ranged from 35% less to 63% more in the evaluated transformed events, cellulose was 13% less to 19% more and hemicellulose varied from less 22% to more 6%. The saccharification improved by up to 34% in the evaluated events of energy cane. Thus, through this work and with other previous works, it was possible to verify that the FT SHN participates in the regulation of different cell wall components in a species-specific and tissue-specific way, showing not only its importance in the metabolic engineering of new plants, but still showing the importance of validating a gene not only in model plants but also in its species of origin.

INTRODUCTION

Lignocellulosic biomass is an abundant alternative source for the production of renewable fuels (MCKENDRY, 2002; ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013). Lignocellulosic materials are mainly composed of three different polymers

associated with each other: cellulose, hemicellulose and lignin (MCKENDRY, 2002). Among these, lignin is considered the main bottleneck for the production of lignocellulosic ethanol through the conversion of cellulose into fermentable sugars also known as second generation (2G) ethanol (CHEN; DIXON, 2007). Lignin is linked to hemicellulose in the cell wall (CW) by ferulic acids (LAM;KADOVA, IYAMA; 2001; de OLIVEIRA et al., 2015) hindering the action of enzymes. In addition, after lignin hydrolysis, phenolic compounds are released which, together with weak acids and furan derivatives, promotes inhibition in the fermentation stage, decreasing the growth and productivity of microorganisms by interfering in the duplication of DNA and causing mutations (SIQUEIRA, 2015), resulting in a lower yield in ethanol production (PALMQVIST; HAHN-HÄDERGAL, 2000). Monolignols coumaryl (H), coniferyl (G) and synaphyl (S) are alcohols that polymerize in different ways, through the action of laccases and peroxidases, giving rise to the various forms of lignin (AZADI et al., 2013; BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2013). The amount of these units (H, G and S) varies among tissues, cell types, and developmental stages (VANHOLME et al., 2010). The synapyl and guaicyl (S/G) ratio is an important parameter for biomass characterization. The composition of lignin is an important factor to be considered when using biomass, the S/G ratio being an important parameter in its characterization (AGARWAL et al., 2019).

Efficient handling of the lignin structure can positively affect the biomass transformation industry (AGARWAL et al., 2019). Chen and Dixon (2007) demonstrated that by silencing genes that encode enzymes participating in the lignin biosynthesis pathway, there was a decrease in the lignin content that effectively overcomes the recalcitrance of CW to bioconversion. Some transgenics have been shown to produce almost twice as much sugar from the CW saccharification process as against those of the wild type, so that modification of the lignin could avoid the need for acid pretreatment and thus facilitate the consolidation of the bioprocess (CHEN; DIXON, 2007). To achieve this goal, it is essential to know the entire lignin biosynthesis pathway as well as the genes that control all the pathway regulation, such as transcription factors (TF). TF have been used to better understand the biosynthetic pathways that

lead to the formation of SCW (ZHAO; DIXON, 2011; GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; HUSSEY et al., 2013).

Currently, it is believed that the regulation of the secondary cell wall (SCW) involves three hierarchical levels with FTs from the NAC family (1st level) being followed by members of the MYB family (2nd and 3rd levels of regulation), with some of these TFs having a species-specific function. [for more details (GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; HANDAKUMBURA; HAZEN, 2012; CESARINO et al., 2016)]. Despite this already established model, a new FT has emerged as a potential regulator for the entire PCS, the FT SHINE (SHN).

The SHN TF belongs to the AP2/ERF family (Ethylene Responsive Factor), and to the SHINE/WAX INDUCER (SHN/WIN) clade (AHARONI et al., 2004). In *Arabidopsis*, three representatives of this subfamily: *AtSHN1*, *AtSHN2* and *AtSHN3* were characterized by Broun et al. (2004) and Aharoni et al. (2004), with *AtSHN1* having the function of wax synthesis in the cuticle of the leaves, which gives them a shiny appearance, which explains the name given later to the gene (AHARONI et al., 2004). However, the overexpression of *AtSHN2* in rice (*Oryza sativa*) showed that SHN is probably involved in CW biosynthesis, increasing cellulose and decreasing lignin content in transgenic plants (AMBAVARAM et al., 2011).

Although there are many studies involving the analysis of TFs in the synthesis of secondary CW in dicots, little is known about their action on monocots of great agronomic importance (AMBAVARAM et al., 2011; HANDAKUMBURA; 2006). In Brazil and others tropical and sub-tropical regions, sugarcane is an important source of sucrose and biomass producer and a commercially important crop (INMAN-BAMBER; SMITH 2005). The expression of *ShSHN* was determined in high biomass tissues in sugarcane (BRITO et al., 2015) and later were overexpressed in rice plants, resulted in plants with an increase in biomass of up to 340%, up to 209% more pectin and 35% less lignin. In addition, it was observed that these plants showed an improving of 60% in saccharification compared with untransformed plants (MARTINS et al, 2018). Thus, SHN shows itself as a potential candidate for obtaining genetically modified plants, aiming to overcome the limitations in the production of 2G

ethanol in the industry. Since the genetic transformation of sugarcane has been used to overcome the limitations of conventional genetic improvement (DAL-BIANCO et al., 2010).

Continuing the previous work of our group, we overexpressed the *ShSHN1* in sugarcane and then we evaluated them for growth, CW biochemical composition (lignin and polysaccharides) and saccharification efficiency. The results here presented showed new findings about the mode of regulation of SHN on the genes of the CW pathway in sugarcane.

In a long-term perspective, it is hoped that the knowledge derived from these studies will not only provide important information about the role of SHN regulators throughout the plant kingdom, but also provide a powerful tool for the metabolic engineering of phenolics and lignin compounds for traditional breeding or through transgenics, with the subsequent impact on second generation ethanol production.

RESULTS

Genomic characterization of *ShSHN1*

From previous analyses, it was possible to identify that the *ShSHN1* transcript is composed of 636 base pairs (bp) translated into 212 amino acids (MARTINS et al., 2018). By using the transcribed sequence of *ShSHN1* in the SUCEST – Fun database, 5 sequences identical to *ShSHN1* were obtained, with homology of up to 99% (Figure 1a). By comparing the sequences obtained, it was observed that the *ShSHN1* gene has two exons and one intron of 102 base pairs, having a total of 738 bp from the initial ATG to the TGA stop sequence (Figure 1b). The gene intron is present at 107 bp from the start codon, unlike other members of the SHN clade, such as the three Arabidopsis genes (AHARONI et al., 2004) and the two eucalyptus genes (MARQUES et al., 2011), in which the intron is positioned 80 bp from the start codon, or in OsSHN1 (AHARONI et al., 2004) and NUD (TAKETA et al., 2008), which one the intron is located 83 bp from the start codon.

Figure 1 - *ShSHN1* genomic data available from SUCEST – Fun. a. distribution of sequences from the blast with the sequence of *ShSHN1*. B. Alignment of the sequence of *ShSHN1* with the sequence of the database. In blue, the location of the intron present in the gene is shown.

ShSHN1 Expression analysis of in transgenic sugarcane plants

The overexpression construction pShSHN1nptII was introduced in sugarcane calli by *Agrobacterium*-mediated transformation by Pangeia Biotechnology. A total of 200 events were obtained from selective medium supplemented with geneticin, and then sent to our lab to more 30 days growing *in vitro* for later acclimatization in a greenhouse and cultivated under identical growing conditions.

The confirmation of transgenic events was performed by real time qPCR, with 99.5% of the events being positive for the presence of the transgene (199 events). A preliminary phenotypic evaluation of the positive events was performed to establish a first trial of selection of T₀ (primary generation or transformant generation) events with 30 days grown in pots, using as criteria events with similar or superior development compared to the non-transformed plants, named by WT (non-transformed) control plants. As a second trial, *ShSHN1* expression analysis by qPCR was evaluated in sixty transgenic events and thirty events were selected based in the criteria of *ShSHN1* overexpression in relation to CP. *ShSHN1* transcript level in the thirty selected T₀ events showed up-regulated til 3500 times higher than NT (Figure 2).

Figura 26 - Expression profile of the transformed events for *ShSHN1* overexpression. Relative gene expression assessed via qPCR in leaves from 30 days sugarcane overexpressing *ShSHN1*.

Biomass content, number of tillers and number of buds in transgenic sugarcane plants

In order to evaluate the effects of *ShSHN1* overexpression in sugarcane phenotype, biometric analyzes of the T₀ mature sugarcane (11 months) in 50L pots were performed. The 26 events overexpressing *ShSHN1* had their biomass increased, such as T308A (310%), T98A (211%) and T152A (181%) that showed the greatest increase in biomass, while event T86B showed a decrease of approximately 30% when compared to WT plants (Table 1). The largest number of tillers was observed in events T152A, T118C, T136B and T62A with an increase of up to 130% in this parameter compared to WT plants (Table 1). Also, event T164A showed a 120% increase in the number of buds compared to NT plants (Table 1).

Table 1 - Biometric analysis of events overexpressing *ShSHN1* and untransformed controls. Biometric analysis in 10 months sugarcane from T₀ of biomass (dry weight in Kg), number of tillers and number of buds.

EVENTS	BIOMASS	NUMBER OF TILLERS	NUMBER OF BUDS
WT	1,13	6	36
T20A	2,38	5	38
T25A	1,98	7	39
T59A	2,13	11	59
T60A	2,57	11	75
T62A	2,47	14	66
T82C	2,04	8	51
T86B	0,81	12	27

T90A	1,64	11	41
T98A	3,55	11	68
T118C	2,3	14	59
T131A	2,6	8	47
T135D	2,65	11	62
T136B	2,64	14	55
T137C	2,31	9	53
T138C	2,54	11	58
T139B	1,83	10	42
T147A	2,23	12	61
T152A	3,21	14	70
T164A	2,46	11	80
T165A	2,53	10	52
T182A	1,87	7	32
T301A	2,04	6	42
T308A	4,68	*	38

Determination of Lignin content and S/G ratio

Therefore, we analyzed the the CW constituents. In order to determine lignin amount and the monomers S, G and H composition, 26 events overexpressing *ShSHN1* with higher transgene expression levels and similar or superior development performance to WT from T₀ with 6 months were analyzed. The analysis of the lignin content of third leaf of each event showed that, in general, the overexpression of *ShSHN1* resulted in a reduction in the lignin content in the leaf, as 22 events showed a reduction of this biopolymer, ranging from 59% (T139B) to 68% (T308A), while only four events (T59A, T60A, T88A and T98A) had their lignin unchanged (Figure 3a). And their S/G ratio, was increased in all events evaluated, ranging from 4% (TC20A) to 71% (T182A), as can be seen in figure 3b.

Figure 3 – Lignin content and S/G ratio in leaves. Analysis of lignin content and S/G ratio of T₀ plants of the SP80-3280 variety overexpressing ShSHN1 at six months of age. **a.** Lignin content determined by the +3 leaf acetyl bromide method; **b.** S/G ratio in +3 sugarcane leaves. WT control plants are represented in black, events overexpressing ShSHN1 are represented in grey.

Hereafter, based on the results from lignin content and S/G ratio in leaves and better phenotypes than the WT, ten transgenic events from T₁ with 7 months were selected for further analyses, described below.

Figure 4a shows the results obtained for the lignin content in rind and pith of internode 8 from culm. Note that, in rind, there was little change between events, with the exception of event T118A, which presented a 15% reduction of lignin, while there was a 20% increase of lignin in event T135D. In contrast, the lignin content in the pith reduced in all events, ranging from 8 to 47%, with exception of event T152A, which did not change.

In the results of the S/G ratio in rind and pith of internode 8 from culm (Figure 4b), there is an increasing trend for both rind and pith. Events T308A and T283A showed an increase in the S/G ratio of 40% in the rind and 24% in the pith, respectively. However, events T138C and T165A showed a decrease in this ratio of 29% and 24% in rind, and 11% and 14% in pith, respectively.

Figure 4 – Lignin content and S/G ratio in internode 8 from culm. Analysis of lignin content and S/G ratio of T₁ plants of the SP80-3280 variety overexpressing *ShSHN1* at eight months of age. **a.** Lignin content determined by acetyl bromide method from culm divided in rind and pith; **b.** S/G ratio from culm divided in rind and pith. WT control plants are represented in black, events overexpressing *ShSHN1* are represented in white (rind) and grey (pith).

The subunits from lignin, coumaryl (H), coniferil (G) and sinafil (S) were also measured, and all events showed a decrease in the S and H subunits from rind when compared to the means of WT events. The G subunit, only the event T165A presented an increase of 16% when compared to the mean of WT events in rind (Table 2).

In the pith, all events overexpressing *ShSHN1* showed a decrease in S and G subunits. For the H subunit, an increase was observed for events T308A, T301A and T283A of 23%, 67% and 98%, respectively (Table 2).

Table 2 – Amount in nmol per 100 mg of material of lignin monomers in sugarcane variety SP80-3280 WT and overexpressing *ShSHN1*.

Amount (nmol) per 100mg of material						
Events	Rind			Pith		
	S	G	H	S	G	H
WT	24,7236	4,5367	32,3044	38,3632	12,4050	40,8501
T118A	15,5346	2,5081	24,2897	34,5527	10,4925	32,1838
T131A	17,5226	2,9806	24,8640	31,9412	10,8213	29,9228

T135D	13,7493	2,2754	24,9690	31,0128	9,4423	38,8921
T136B	18,3156	3,2472	25,6293	35,2234	11,3325	37,3982
T138C	15,9174	3,9847	26,6974	27,1432	9,8814	33,7942
T152A	18,7388	3,4112	23,3585	36,5847	10,7242	26,8108
T165A	22,4008	5,2450	25,0843	25,1883	9,4838	34,5141
T283A	21,7049	3,9351	21,8671	20,7592	5,4238	78,1118
T301A	22,5865	3,8717	21,2233	30,4535	9,1743	66,1262
T308A	20,9178	2,6533	15,6026	30,7434	10,4509	48,5415

Evaluation of pectin, hemicellulose and cellulose content

To complement the analysis of CW composition in sugarcane overexpressing *ShSHN1*, pectin, hemicellulose and cellulose content were evaluated in rind and pith of internode 8.

The pectin analysis shown in Figure 5a showed that, in rind, there was a decrease in all events, which ranged from 20% (T136B) to 53% (T118A). On the other hand, in pith, events T138C, T118A, T283A and T135D increased pectin content from 11% to 59%, while the other six events showed a reduction of 15% (T165A) to 64% (T152A).

The hemicellulose content (Figure 5b) evaluated showed an increase in the rind of events T165A (64%), T308A (36%) and T283A (31%), and in the pith of events T138C (58%), T165A (41%) and T118A (26%). However, events with a reduction of up to 52% of hemicellulose in rind (T131A) and of up to 66% in pith (T301A) were also observed.

As demonstrated in the other components of the CW, there was a variation in the cellulose content between evaluated events (Figure 5c). For rind, six events showed an increase of 17% (T135D) to 98% (T136B) of cellulose, while in the pith the increase ranged from 8% to 59% (T152A, T165A, T136B and T138C). On the other hand, events T131A, T308A, T118A and T301A showed a reduction of 9% to 17% of cellulose in the rind, and from 24% to 63% in the pith.

Figura 27 – Pectin, hemicellulose and cellulose content in internode 8 from culm. Percentage of pectin, hemicellulose and cellulose in the CW in eighth months of age T₁ sugarcane overexpressing *ShSHN1*. **a.** Pectin content; **b.** Hemicellulose content; **c.** Cellulose content. WT control plants are represented in black, events overexpressing *ShSHN1* are represented in white (rind) and grey (pith).

Saccharification efficiency

To understand the impacts of changes of CW components in conversion of polymeric sugars in reducing sugars, the saccharification percentage was evaluated. Saccharification showed an improvement of 41% (T138C) to 465% (T301A) in pith, and also a reduction of 19% to 66% (T165A, T152A and T135D). In rind, half of the evaluated events showed an increase of 6% (T118A) to 151% (T301A), while the other events showed a reduction of 3% (T138C) to 63% (T165A), as shown in Figure 6.

Figura 28 – Saccharification efficiency in internode 8 from culm. Percentage of saccharification in rind and pith from eight months eighth internode in T₁. WT control plants are represented in black, events overexpressing *ShSHN1* are represented in white (rind) and grey (pith).

Gene expression profile of the cell wall related genes in sugarcane overexpressing *ShSHN1*

The expression profile of the *ShSHN1* gene was confirmed in the selected events. Figure 7a shows high abundance of transcripts in events T136B (296-fold) and T283A (233-fold), followed by events T138C (96-fold) and T165A (88-fold) when compared to WT plants.

Genes C3H, and CAD-B showed no difference in expression when compared to NT plants in any of the events evaluated (Figure 7b, h). The expression of genes C4H and 4CL, events T283A and T138C showed a significant reduction of 2.2 and 2.4 times in expression compared to WT plants, respectively (Figure 7c, f). As for the F5H gene, in all events evaluated, a reduction in expression was observed when the *ShSHN1* gene was overexpressed, with a significant reduction of 1.5 times for events T138C and T136B (Figure 7d). In the evaluation of the HCT genes, the T136B events showed a significant 2.9-fold increase in expression compared to WT plants, and a 1.5-fold reduction in the

T165A event (Figure 7e). The same expression profile was observed for the COMT gene, in which event T283A had its expression increased by 1.8 times, while events T138C and T136B showed a significant reduction of 2.7 and 1.5 times compared to WT plants, respectively (Figure 7g).

Figure 7 - Analysis of the expression of genes related to CW synthesis in sugarcane overexpressing *ShSHN1*. a. *ShSHN1*; b. *C3H*; c. *C4H*; d. *F5H*; e. *HCT*; f. *4CL*; g. *COMT* and h. *CAD-B*. WT control plants are represented in

black, events overexpressing *ShSHN1* are represented in grey. Asterisks represent significant expression data.

DISCUSSION

***ShSHN1* overexpression increases biomass amount in transgenic sugarcane plants**

The values of relative expression showed a high amplitude, what it may be due to the number of copies and position effect of the inserted transgene (KOHLI et al., 2006). The number of copies of the transgene, are in general associated with higher levels of expression. On the other hand, the transgene insertion site can also modulate the transcript level, since regions of the genome known as hotspots represent sequences that have signals for intense transcription activity (ARENCIBIA et al., 1998; KOHLI et al., 1999). However, the fact that the gene is being expressed does not imply that the protein is being translated, as different post-transcriptional processes, processes during translation and even post-translational ones can influence the presence of the final product (KOHLI et al., 2006).

The *ShSHN1* overexpression in sugarcane impacted in an increase in biomass, such as found by overexpressing TF SHN in other species (MARTINS et al., 2018; WUDDINEH et al., 2015; LIU et al., 2017). The sugarcane transgenic event (T308A) showed a 310% increase in dry weight, similar to the 340% increase in dry weight presented by rice plants overexpressing *ShSHN1* (MARTINS et al., 2018) and higher than increase observed in transgenic switchgrass overexpressing SHN (*PvERF001*) (WUDDINEH et al., 2015). We also analyzed the number of tillers, which was the parameter that seemed to be involved with this increase in sugarcane biomass, showing an increase in tillering for up to 130% higher in the events (T152A, T118C, T136B and T62A) compared to WT plants. The increase in tillering were also found in *ShSHN1* (MARTINS et al., 2018) and *OsWR2* (ZHOU et al., 2013) transgenic rice plants. Tillering is closely associated with yield in monocots, besides that a little is knowing about of physiology and genetics of tillering (YADAV et al., 2015), and

the findings here added to others about SHN TF may be the way to discover more about tillering.

The alterations in plant cell wall composition caused by the *ShSHN1* overexpression resulted in plants with better saccharification efficiency

Overexpression of *ShSHN1* promotes alterations of plant cell wall composition impacting on saccharification efficiency

In this study, we have checked changes in lignin amount and composition in three different sugarcane tissues (leaves, pith and rind from culm).

In leaves, we have found a reduction of up to 68% (T308A) of lignin content, greater than those observed when overexpressing *ShSHN1* in rice by 34.4% (MARTINS et al., 2018), *PsnSHN2* in tobacco of 34% (LIU et al., 2017) and *AtSHN* in rice 45% (AMBAVARAM et al., 2011). The decrease in lignin amount was also observed in culms (rind and pith). Some sugarcane events overexpressing *ShSHN1* showed a decrease of lignin that reached 15% in rind (T118A) and 47% in pith (T301A). This decrease of lignin could explain the improvement of saccharification of 265% in pith of T301A event. This finding corroborates the currently knowledge about lignin and its effect on cell recalcitrance and the saccharification process for the production of 2G ethanol (ACKER et al., 2013; GUO et al., 2009).

The overexpressing of *ShSHN1* in sugarcane also affected the composition of lignin. The S/G ratio was altered in both leaves and internodes. A large variation in the S/G ratio was found in rind and pith. The results also showed a tendency in the increase of S/G ratio in rind, while amount of lignin tended to remain the same in events overexpressing *ShSHN1*, evidencing that *ShSHN1* acts more in the composition of lignin than in the amount of lignin in sugarcane rind from eighth internode. The ratio S/G can be changed by the increase or decrease of each subunit. As showed in Table S2 in Supplementary material, for the rind tissue from the eighth internode, both subunit S and G from lignin tended to decrease. Already for the pith tissue, only S subunit tended to decrease, while G subunit apparently did not change. For leaves it was observed that S subunit

showed tendency to increase, while subunit G tended to decrease, differently from what was found overexpressing AtSHN2 in rice (AMBAVARAM et al., 2011). This could be explained by SHN mode of action specie-specific or tissue-specific, acting on different target or even acting different on same target depending on analyzed species and/or tissue. Regarding unit H, the events T283A and T301A, showed a great increase 118% and 84%, respectively.

To complement CW characterization in transgenic plants we also analyzed other CW components, such as pectin, hemicellulose and cellulose. The amount of pectin showed a tendency to decrease in plants overexpressing *ShSHN1* in both rind and pith. However, three transgenic plants showed an increase of up to 59% of pectin in the pith tissue (T138C, T118A, T283A and T135D). The increase in pectin synthesis was previously showed in the aerial parts of rice overexpressing *ShSHN1* (MARTINS et al., 2018). In the flower organs of *Arabidopsis* plants with reduced activity three members of SHN TF presented a reduced expression of genes related to pectin metabolism (SHI et al., 2011). Therefore, with the results presented before in rice and *Arabidopsis*, together with our analysis it is plausible to suggest that FT SHN is also involved in regulating and accumulation of pectin in sugarcane culms. In addition, Martins et al. (2018) speculated that *ShSHN1* transgenic rice, the lignin reduction and pectin increase might be related to gains in biomass increasement. Although *ShSHN1* transgenic sugarcane showed lignin reduction and biomass increasement as *ShSHN1* transgenic rice (MARTINS et al., 2018), the present results did not show an evident pectin increase, suggesting that *ShSHN1* action mode on pectin metabolism that might be different in species or tissues evaluated.

The amount of hemicellulose decreased in *ShSHN1* events, in pith and rind. However, some events showed an increase in hemicellulose in the rind of up to 64% and up to 58% in pith. We observed that the events with more hemicellulose presented a worsening in saccharification, such as the event T165A. The event T165A present in pith 25% less lignin and 28% more cellulose, and besides that, the saccharification was 64% less efficient than WT. We conclude that it must be because of the increase of 41% in hemicellulose content. The loss of efficiency in saccharification linked to increase from

hemicellulose content was also observed in pith from T165A and T138C, and rind from T283A. The opposite is also true, plants with less hemicellulose content presented saccharification improvement, such as in pith from T283A, T301A and T308A, that have less cellulose than WT, and in rind from T301A, that showed no difference with WT in lignin content.

The cellulose quantity showed increased in five sugarcane transgenic events overexpressing *ShSHN1* in rind, which corroborates to an increase in cellulose content of *PsnSHN2* transgenic tobacco (LIU et al., 2017), *ShSHN1* transgenic rice (MARTINS et al., 2018) and *AtSHN2* transgenic rice (AMBAVARAM et al., 2011), respectively 37%, 10-22% and 34%.

ShSHN1 transgenic sugarcane showed a global CW modification, promoting the improvement of digestibility of cellulose into glucose, i.e., saccharification.

The present results were a preliminary study to characterized and identify the events most promising to proceed to field evaluation. Ten events were selected to be evaluated with replication in a non-controlled environment in field. Evaluation in the field is costly, complex and very slow (YADAV et al., 2015), however, it is primordial to release new technology. To deepen our expertise, our group produced transgenic energy cane varieties overexpressing *ShSHN1*, the *Saccharum ssp* biotype developed to produce bioenergy, with high fiber content and high biomass production as characteristics. Unlike to previous findings, although *ShSHN1* transgenic events showed reduction in amount and changed composition of lignin, surprisingly, no compromise in plant development and defective phenotypes were observed. Instead, it was observed a tendency to development improvement in the transgenic events. Regarding the pathogens and insects plant defense, further studies will be conducted.

The expression of F5H showed a positive correlation with the S/G ratio both in the core and in the shell of the analyzed events. While for the COMT gene this relationship was only found for events T138C and T136B. The same relationship was not found in *S. spontaneum* and *S. officinarum* (LLERENA et al., 2019). The relationship between decreased expression and decreased S/G ratio was also observed for the HCT gene in events T165A and T283A, as

observed by Bottcher et al. (2013). Such genes are encoded by single genes, unlike the others analyzed here, which have several members in their families (BOTTCHER et al., 2013).

Regarding the amount of lignin in the events evaluated, for the COMT gene a negative correlation was found in events T136B and T283A, while for the HCT gene the correlation for the same events was positive, in bark. In the core, event T138C was positively correlated with COMT and negatively correlated with HCT and event T165A was positively correlated with HCT and negatively correlated with COMT.

The power of SHN TF on biotechnology industry

The SHN TF is considered a master regulator in plant CW biosynthesis (AMBAVARAM et al., 2011) which generated interest in several groups to study this TF in different cultures (Table 3).

In the first studies, the existence of three SHN genes in *Arabidopsis* was verified (*AtSHN1*, *AtSHN2* and *AtSHN3*). For their surprise, these genes are related to different functions and their expression was observed at different ages and parts of the plant: plants overexpressing *AtSHN1* showed greater tolerance to drought; the *AtSHN2* gene is involved with floral organs, and is poorly expressed in leaves; and the *AtSHN3* gene is constitutively expressed throughout the plant (AHARONI et al., 2004). The differences in SHN functions and locals and ages of expression were also observed between dicots and monocots (Table 3).

The first evaluations were carried out in dicots and the functions of SHN in these organisms are mainly related to the synthesis of wax and cutin (AHARONI et al. 2004; Shi et al., 2011; KANNANGARA et al., 2007; BROUN et al., 2004; SHI et al., 2013; Al-ABDALLAT et al., 2014; BUXDORF et al., 2014; JÄGER et al., 2015; LASHBROOKE et al., 2015; XU et al., 2016). Others studies with SHN in dicots revealed that it can be related to tolerance to abiotic stress (DJEMAL; KHOUDI, 2016) and to salt, osmotic and heat stress tolerance with changes in cuticle permeability and lower stomata density (DJEMAL;

KHOUD, 2021a), besides of plants more tolerant to heavy metals (cadmium, copper and zinc) and better biomass accumulation (DJEMAL; KHOUD, 2021b).

The findings about better biomass accumulation were more evident in monocots, starting with the overexpression of a dicot SHN in a monocot organism. Ambavaram et al. (2011) observed that rice overexpressing *AtSHN2* presents cellulose increase and lignin decrease, 2G ethanol industry wishes. The overexpression of a SHN from switchgrass in switchgrass resulted in plants with more biomass, but no decrease in lignin (WUDDINEH et al., 2015).

The results observed in monocots, draw our group attention and studies with *ShSHN1* started by overexpressing it in rice (MARTINS et al., 2018). Our findings were rice with more biomass and less lignin, in addition to more pectin and better results in saccharification.

Table 3 - Different phenotypes presented in different organisms and their different approaches

Gene	Technique	Organism (*)	Phenotype and Metabolic Path Involved	Reference
<i>AtSHN</i>	Overexpression	<i>Arabidopsis</i> (di)	Biosynthesis of Wax and Cutin	(AHARONI et al. 2004; Shi et al., 2011; KANNANGARA et al., 2007; BROUN et al., 2004)
<i>SISHN</i>	Overexpression and Silencing	Tomato (di)	Biosynthesis of Wax and Cutin	(SHI et al., 2013; Al-ABDALLAT et al., 2014; BUXDORF et al., 2014)
<i>TaSHN</i>	Overexpression	<i>Arabidopsis</i> (di)	Biosynthesis of Wax and Cutin	(JÄGER et al., 2015)

<i>MdSHN3</i>	QTL*	Apple (di)	Biosynthesis of Wax and Cutin	(LASHBROOKE et al., 2015)
<i>GmSHN1/</i> <i>GmSHN9</i>	Overexpression	<i>Arabidopsis</i> (di)	Biosynthesis of Wax and Cutin	(XU et al., 2016)
<i>TaSHN1</i>	Overexpression	Tobacco (di)	Multiple tolerance to abiotic stress	(DJEMAL; KHOUDI, 2016)
<i>NUD</i>	Overexpression	Barley (mo)	Change in lipid deposition in the pericarp	(TAKETA et al., 2008)
<i>AtSHN2</i>	Overexpression	Rice (mo)	Aumento de celulose e Diminuição de Lignina	(AMBAVARAM et al., 2011)
<i>OsWR1</i>	Overexpression	Rice (mo)	Biosynthesis of Wax and Cutin	(WANG et al., 2012)
<i>PvERF001</i>	Overexpression	<i>Switchgrass</i> (mo)	Biomass increase without lignin change	(WUDDINEH et al., 2015)
<i>HvSHN1</i>		Barley (mo)	Expression induced by salt, cold, heat and dry stress.	(DJEMAL et al., 2016)
<i>ShSHN1</i>	Overexpression	Rice (mo)	Increase in biomass and lignin decrease	(MARTINS, 2017; MARTINS et al., 2018)
<i>TaSHN</i>	Overexpression	Wheat (mo)	Modifications to the leaf surface and improves drought tolerance	(BI et al., 2018)
<i>PeERF1</i>	Silencing and Overexpression	<i>Phalaenopsis</i> (mo) and <i>Arabidopsis</i> (di)	Morphological formation of epidermal cells in orchid flowering. Biosynthesis of wax	(LAI et al., 2020)

			and cutin in <i>Arabidopsis</i>	
<i>HvSHN1</i>	Overexpression	Tobacco (di)	Plants more tolerant to salt, osmotic and heat stress. Change in cuticle permeability and lower stomata density.	(DJEMAL; KHOUD, 2021a)
<i>TdSHN1</i>	Overexpression	Tobacco (di)	More tolerant plants to heavy metals (cadmium, copper and zinc) and better biomass accumulation	(DJEMAL; KHOUD, 2021b)
<i>ShSHN1</i>	Overexpression	Sugarcane (mo)	Increased biomass and improved saccharification	Our data

Through the results observed in rice overexpressing *ShSHN1*, we started the studies in a new organism, sugarcane. Sugarcane overexpressing *ShSHN1* showed plants with less lignin in leaves and rind and pith, with some increase in S/G ratio (Table 4). We found some differences in the results between rind and pith, such as for pith, some events presented an increase in pectin content, for rind, the pectin was only decreased in all events, differently than the found by Martins et al. (2018).

Differences in functions of the overexpression from the same TF in different organisms were also verified by Lai et al. (2020). The SHN from orchids (PeERF1) were overexpressed in orchid and *Arabidopsis*. While in orchids PeERF1 is expressed only in stage 5, when the flowers open, in specific flower petals, in *Arabidopsis* produced shiny leaves on the adaxial surface.

Through our studies, it was possible to observe that *ShSHN1* is more related to the sugarcane pith, changing more effectively the amount and composition of

CW, while in rind the change in CW composition was more expressive (Table 4).

Table 4 - Summary of cell wall quantifications with *ShSHN1* overexpression in sugarcane (SP80-3280)

	SP80-3280 (leave)	SP80-3280 (Rind)	SP80-3280 (Pith)
Pectin	*	-20 a -53%	-64% a +59%
Cellulose	*	-17 a +98%	-63 a +59%
Hemicellulose	*	-52% a +64%	-66% a +58%
Ligin	-68% a +5%	-15% a +21%	-47% a +5%
S/G Ratio	+4 a +71%	-29% a +40%	-14% a +24%
Saccharification	*	-64 a +159%	-66% a +466%

* Data not evaluated

CONCLUSIONS

Our results shown that SHN can be involved in the synthesis of different components of CW also in sugarcane. We observed that *ShSHN1* is involved with the decrease of lignin, the increase of biomass and the decrease of pectin in rind. In addition, our observations reinforced that SHN TF can maybe act in specie-specific way and the present results revealing SHN in sugarcane can act specifically in each tissue. Sugarcane overexpressing *ShSHN1* is already in field test, to verify its performance in uncontrolled environment. We also produced *ShSHN1* transgenic energy cane to evaluate how this gene will behave in a cane species with a greater amount of fiber. Since lignocellulosic biomass has great potential to produce 2G ethanol, we believe that the SHN TF may have a relevant contribution to improve this raw material in the industry.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining Genomic Data from ShSHN1

From the sequencing data of the vector pDESTSHN, previously obtained by Martins et al., (2017), the transcribed *ShSHN1* sequence was obtained. In order to verify the genomic sequence of *ShSHN1*, this sequence was then verified in the Sugarcane Functional Genomics Database (Sucest – Fun).

Therefore, sugarcane overexpressing the sugarcane SHN1 gene (*ShSHN1*), were analyzed using the strategies described in Figure 1a and presented below.

Figura 8 – ShSHN1 overexpression in sugarcane. A. Workflow for elucidation of *ShSHN1* overexpression in sugarcane transgenic plants. **B.** Schematic representation of the pShSHN1nptII construct with nptII (geneticin) selection marker and *ShSHN1* expression cassettes.

Plant material and generation of transgenic plants

The expression cassette obtained previously by Martins et al. (2018) (pUbi1-ShSHN1-T35S) (Figure 8b) was bonded to the destination vector suitable to selection of sugarcane transformant cells in tissue culture, pJFNPTII (DERMAWAN et al., 2016; ALTPETER et al., 2000), kindly provided by Prof. Dr. Fredy Altpeter (Agronomy Department, Plant Molecular and Cellular Biology Program, Genetics Institute, University of Florida, IFAS, Gainesville, FL, USA), containing nptII gene as selection marker. The expression cassette construction was named pShSHN1nptII.

The sugarcane SP80-3280 was genetically transformed by the company PangeiaBiotech / Plant Transformation Facility, Campinas, SP – Brazil. More than 200 different events and 50 CP were received in solid M&S medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962). The seedlings were transferred to liquid M&S medium, added with M&S vitamins, 20 g/L sucrose, 20 mg/L of the antibiotic Meropenem (to control *Agrobacterium*) and 30 mg/L of geneticin, to select transformed plants. The plants were grown for 30 days in a light room, at 26°C, photoperiod of 16 hours of light, and light intensity of 1800 Lux. Next, they were transferred to a high humidity greenhouse, for better adaptation of the seedlings. After 2 weeks, they were transferred to a normal greenhouse in 50L pots.

Molecular confirmation of positive transgenic events

To confirm the T-DNA presence, total DNA was isolated using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Fitchburg, WI, USA). The primers ShSHN92-F CACAGTCCACATCAGCAACA and T35S-R CGGGGGATCTGGATTTTAGTA was used in the amplification reactions. The RT-qPCR reactions were conducted in iQ5 multicolor Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad) containing GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA) in a total volume of 10µL, according to manufacturer's instructions. The reaction was started with an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles

of denaturation 95 °C for 10 s; 55 °C for 30 s, at the end a dissociation curve profile (melting curves) were carried out.

Biometric analysis of plant material

T₀ transgenic plants, with no replication, and WT were transferred to 50L pots in greenhouses and cultivated under identical growing conditions. The biometric analysis were conducted in T₀ and T₁ (sprouted after first cut), with age of ten months, following the method proposed by Landell; Silva (2000).

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from first leaves using TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and DNA was removed by using DNase (Promega, Fitchburg, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The synthesis of cDNA was performed using *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega, Fitchburg, WI, USA), following the instructions. The RT-qPCR reactions were conducted as described previously, using primers described on table 5. The gene GAPDH was used as reference gene (ISKANDAR et al., 2004). For the calculation of relative gene expression, the comparative $\Delta\Delta C_t$ method was used. The generated C_t values were transformed into $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), followed by comparison of the average of transgenic and WT samples.

Table 5 - Primers used to quantify the expression of ShSHN1 and genes related to CW.

Gene	Primer sequence (5' – 3')	Reference
SHN 113 – Fw	CCACTCCAGGAAAATGGTACA	Martins, 2017
SHN 113 – Rv	CCAGCCAGACCCTCCTCTTA	
GAPDHi – Fw	TTGGTTTCCACTGACTTCGTT	Iskandar et al., 2004
GAPDHi – Rv	CTGTAGCCCCACTCGTTGT	

4CL Fw	AAATCCCTGTCGCCTTCATC	Llerena et al., 2019
4CL Rv	CTTGTAGAACACGACCTCCTTG	
C3H Fw	GTCATGTTAGAGACCGACTTCC	
C3H Rv	TAGCCACCGATCTTGACATTC	
C4H Fw	CTTCCTGGAGGAGGAGAAGA	
C4H Rv	CAGGGTGATGCCGATGATAG	
CAD-B Fw	CCAGTTCTGCGTCGACAA	
CAD-B Rv	CGGTAGCGGACGTCGTT	
COMT Fw	CGCAGATCAAGGGCATCAA	
COMT Rv	CGGCACCGACTTGAACAT	
F5H Fw	AGGACCAGGAGGAGTTCAT	
F5H Rv	AGGAAGTCGCCGATGTTG	
HCT Fw	CTACTTCGGCAACGTGATCTT	
HCT Rv	AGTACCCGTCGTCCATCC	

Cell wall polysaccharides, lignin content and saccharification efficiency

First, the analysis were carried out in 24 events and 8 WT from T₀ with 6 months of age, using the third leave. Then, the analysis were realized in 10 events and 4 WT from T₁ with eight months of age, in a portion of the culm comprising the eighth internode, which was separated into rind and pith as proposed by Brito et al. (2014). The plant tissues were powder and lyophilized by five days. The determination of the percentages of cellulose, hemicellulose and pectin was carried out according to the methodology described by Chen et al. (2002). The total sugar content in each fraction was obtained according to the sulfuric phenol method with three technical replicates, using glucose as a standard (DUBOIS et al., 1956).

To quantify lignin, the acetyl bromide (AcBr) method was used (JOHSON; MOORE; ZANK, 1961). And the determination of S/G ratio was performed as described by MOKOCHINSKI et al. (2015).

The percentage of saccharification was determined according to the methodology described by BROWN; TORGET, 1996, with the modifications described by LLERENA et al. (2019).

REFERENCES

- AGARWAL, U. P. et al. Estimation of Syringyl Units in Wood Lignins by FT-Raman Spectroscopy. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 67, n. 15, p. 4367-4374, 2019. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06707>.
- AHARONI, A. et al. The SHINE Clade of AP2 Domain Transcription Factors Activates Wax Biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and Confers Drought Tolerance when Overexpressed in Arabidopsis. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.2463-2480, 19 ago. 2004. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.022897>.
- ALTPETER, F.; XU, J.; AHMED; S. Generation of large numbers of independently transformed fertile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Plants of Forage- and turf-type cultivars. **Mol. Breed.** 6,p. 519–528, 2000.
- AMBAVARAM, M. M. R. et al. Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 155, n. 2, p.916-931, 2010. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.168641>.
- ARENCIBIA, A. et al. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 99-109, 1998.
- BRITO, M. S. et al. Expression Profile of Sugarcane Transcription Factor Genes Involved in Lignin Biosynthesis. **Tropical Plant Biology**, v. 8, n. 1-2, p.19-30, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-015-9147-y>.
- BROUN, P. et al. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 13, p. 4706-4711, 2004. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0305574101>.
- BROWN L.; TORGET; R. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, chemical analysis and testing task laboratory analytical procedures (LAP 009). NREL Biomass Program, 1996.
- BOTTCHER, A. et al. Lignification in Sugarcane: Biochemical Characterization, Gene Discovery, and Expression Analysis in Two Genotypes Contrasting for Lignin Content. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1539–1557, 2017. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225250>.
- BUXDORF, K. et al. The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants. **Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 84, n. 1-2, p. 37-47, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-013-0117-1>.
- CASSAN-WANG, H. et al. Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis. **Frontiers In Plant Science**, v. 4, n. 189, 2013. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00189>.

CESARINO, I. et al. Building the wall: recent advances in understanding lignin metabolism in grasses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, p. 269-283, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-016-2293-5>.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 7, p.759-761, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1316>.

COOPER, G.M. **The cell**. 2^o. ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

DAL-BIANCO, M. et al. Sugarcane improvement: how far can we go?. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 23, n. 2, p.265-270, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.002>.

DAVISON, B. H. et al. Variation of S/G ratio and lignin content in a populus family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 130, n. 1-3, p.427-435, 2006. <http://dx.doi.org/10.1385/abab:130:1:427>.

de OLIVEIRA, D. M. et al. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p.1224–1232, 2015.

DERMAWAN, H. et al. Development of an intragenic gene transfer and selection protocol for sugarcane resulting in resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicide. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (Pctoc)**, v. 126, n. 3, p. 459-468, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-016-1014-5>.

DJEMAL, R.; KHOUDI, H. TdSHN1, a WIN1/SHN1-type transcription factor, imparts multiple abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 131, p.89-100, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.07.005>.

DJEMAL, R. et al. Molecular cloning and characterization of novel WIN1/SHN1 ethylene responsive transcription factor HvSHN1 in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 228, p.39-46, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.019>.

DJEMAL, R.; KHOUDI, H.. The barley SHN1-type transcription factor HvSHN1 imparts heat, drought and salt tolerances in transgenic tobacco. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 164, p. 44-53, 2021a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.018>.

DJEMAL, R.; KHOUDI, H. The ethylene-responsive transcription factor of durum wheat, TdSHN1, confers cadmium, copper, and zinc tolerance to yeast and transgenic tobacco plants. **Protoplasma**, [S.L.], 13 p., 2021b. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-021-01635-z>.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>

GRAY, J.; CAPARROS-RUIZ, D.; GROTEWOLD, E. Grass phenylpropanoids: Regulate before using! **Plant Science**, v. 184, p.112-120, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.008>.

GUI, J.; SHEN, J.; LI, L. Functional characterization of evolutionarily divergent 4-coumarate: Coenzyme A ligases in rice. **Plant Physiology**, v. 157, p.574–586, 2011.

GUO, D. M.; RAN, J. H.; WANG, X. Q. Evolution of the Cinnamyl/Sinapyl Alcohol Dehydrogenase (CAD/SAD) Gene Family: The Emergence of Real Lignin is Associated with the Origin of Bona Fide CAD. *J Mol Evol*, v. 71, p. 202–218, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00239-010-9378-3>

HANDAKUMBURA, P. P.; HAZEN, S. P. Transcriptional Regulation of Grass Secondary Cell Wall Biosynthesis: playing catch-up with *arabidopsis thaliana*. **Frontiers In Plant Science**, v. 3, 6 p., 2012. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00074>.

HE, Y. et al. Lignin composition is more important than content for maize stem cell wall degradation. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.384-390, 25 set. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8630>.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p.804-807, 2007. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137016>.

HOANG, N. V. et al. Association of gene expression with biomass content and composition in sugarcane. **Plos One**, v. 12, n. 8, p.1-31, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183417>.

HUANG, J. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. **Plant Physiol**, v. 153, p. 1526–1538, 2010.

HUSSEY, S. G. et al. Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. **Frontiers In Plant Science**, v. 4, 21 p., 2013. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00325>.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2-3, p. 185-202, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.023>.

ISKANDAR, H. et al. Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 325-337, 2004. [10.1007/BF02772676](https://doi.org/10.1007/BF02772676).

JÄGER, K. et al. Expression of a WIN/SHN-type regulator from wheat triggers disorganized proliferation in the *Arabidopsis* leaf cuticle. **Biologia Plantarum**, [s.l.], v. 59, n. 1, p.29-36, 7 nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-014-0471-0>.

JOHNSON, D. B.; MOORE, W. E.; ZANK, L. C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **Tappi**, v. 44, p 793–798, 1961.

KIYOTA, E.; MAZZAFERA, P.; SAWAYA, A. C. H. F.. Analysis of Soluble Lignin in Sugarcane by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with a Do-It-Yourself Oligomer Database. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p.7015-7020, 8 ago. 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/ac301112y>.

KOHLI, A. et al. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. **Planta**, v. 208, p. 88-97, 1999.

KOHLI, A. et al. The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, p.185-195, 2006.

LAGAERT, S.; BELIËN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p.1064–1073, 2009.

LAI, P. et al. PeERF1, a SHINE-Like Transcription Factor, Is Involved in Nanoridge Development on Lip Epidermis of Phalaenopsis Flowers. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 101, n. 1, 19 p., 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01709>.

LAM, T. B. T.; KADOYA, K.; IYAMA, K. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. **Phytochemistry**, v. 57, p. 987–92, 2001.

LARSEN, J. et al. The IBUS Process: Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. **Chemical Engineering & Technology, Weinheim**, v. 31, n. 5, p. 765–772, 2008.

LI, X. et al. *FLEXIBLE CULM 1* encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. **Plant Mol Biol**, v.69, p.685–697, 2009.

LIU, Y. et al. Functional characterization of populus psnshn2 in coordinated regulation of secondary wall components in tobacco. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.678-689, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00093-z>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LLERENA, J. P. P. et al. Deposition of lignin in four species of Saccharum. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42350-3>.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 32, n. 7, p.582-595, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.12.006>.

MALÇA, J.; FREIRE, F. Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bio-ethyl tertiary butyl ether (bioETBE): Assessing the

implications of allocation. **Energy**, [s.l.], v. 31, n. 15, p.3362-3380, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2006.03.013>.

MANISHA, S. K. Y. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 245, p.1727-1739, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.066>.

MARQUES, W. L. et al. Exploring a new model of cell wall regulation: identification and expression of two putative shins transcription factors in eucalyptus. **Bmc Proceedings**, [S.L.], v. 5, n. 7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-5-s7-p166>.

MARTINS, A. P. B. et al. Ectopic expression of sugarcane SHINE changes cell wall and improves biomass in rice. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 119, p.322-334, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.036>.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 37-46, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00118-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00118-3).

MOKOCHINSKI, J. B. et al. Metabolic responses of Eucalyptus species to different temperature regimes. **Journal Of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 5, p. 397-411, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.12626>

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

OLIVEIRA, A. R. et al. Análise biométrica de cultivares de cana-de-açúcar cultivadas sob estresse hídrico no vale do submédio são francisco. **Energia na Agricultura**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.48-69, 20 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.17224/energagric.2016v31n1p48-58>.

OOKAWA, T. et al. Increased lodging resistance in long-culm, low-lignin *gh2*rice for improved feed and bioenergy production. **Science Report**, v.4, p.6567, 2014.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p.25-33, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(99\)00161-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(99)00161-3).

PAES, L. A. F.; OLIVEIRA, M. A. Potential trash biomass of the sugar cane plant in Biomass Power Generation. **Sugarcane Bagasse and Trash**, S. J. Hassuani, M. L. R. V. Leal, and I. C. Macedo, Eds., p. 19, PNUD and CTC, Piracicaba, Brazil, 1st edition, 2005.

POMPIDOR, N. et al. Three founding ancestral genomes involved in the origin of sugarcane. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 127, n. 6, p. 827-840, 26 fev. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcab008>.

POPPE, M. K.; CORTEZ, L. B. Sustainability of sugarcane bioenergy. 1 ed., Center for Strategic Studies and Management (CGEE), Brasília, Brazil, Corporate Financial Center, 2012.

RIECHMANN, J. L. et al. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. **Science**, [s.l.], v. 290, n. 5499, p.2105-2110, 15 dez. 2000. <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5499.2105>.

ROHDE, A. et al. Molecular phenotyping of the *pa/1* and *pa/2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. **Plant Cell**, v. 16, p. 2749–2771, 2004.

RUSHTON, P. J. et al. TOBFAC: the database of tobacco transcription factors. **Bmc Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p.53-60, 2008. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-53>.

SABALLOS, A. et al. *Brown midrib2 (Bmr2)* encodes the major 4-coumarate: Coenzyme A ligase involved in lignin biosynthesis in sorghum. **Plant Journal**, v.70, p.813–830, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning 2nd ed. Estados Unidos. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SCHILLMILLER, A. L. et al. Mutations in the *cinnamate 4-hydroxylase* gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. **Plant J**, v. 60, p.771–782, 2009.

SHI, J. X. et al. SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. *Plos Genetics*, [S.L.], v. 7, n. 5, 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001388>.

SHI, J. X. et al. The tomato S I SHINE 3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. **New Phytologist**, [S.L.], v. 197, n. 2, p. 468-480, 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12032>.

SOUZA, A. P. de et al. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.564-579, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAKETA, S. ET AL. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 4062-4067, 2008. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711034105>.

TAMAGNONE, L. et al. The *AmMYB308* and *AmMYB330* Transcription Factors from *Antirrhinum* Regulate Phenylpropanoid and Lignin Biosynthesis in Transgenic Tobacco. **The Plant Cell**, v. 10, p.135-154, 1998.

TAVARES, S. R. L.; SANTOS, T. E. Uso de diferentes fontes de biomassa vegetal para produção de biocombustíveis sólidos. **Holos**, v. 5, p.19-27, 2013.

UDVARDI, M. K. et al. Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p.538-549, 2007.

VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.155119>.

WANG, H. Z.; DIXON, R. A. On-off Switches for Secondary Cell Wall Biosynthesis. **Molecular Plant**, v.5, p.297–303, 2012.

WANG, M. et al. A. Well-to wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. **Environ Res . Lett.**, v. 7, n. 4, p. 045905, 2012.

WEI, H. et al. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 160, n. 10, p.1241-1251, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-01086>.

WILDHAGEN, H. et al. Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*†. **Tree Physiology**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.320-339, 2017. <http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpx054>.

WUDDINEH, W. A. et al. Identification and molecular characterization of the switchgrass *ap2/erf* transcription factor superfamily, and overexpression of *pverf001* for improvement of biomass characteristics for biofuel. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, v. 3, p.321-342, 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2015.00101>.

XU, B. et al. Silencing of 4-coumarate: Coenzyme A ligase in switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production. **New Phytology**, v.192, p.611–625, 2011.

XU, Y. et al. Overexpression of the transcription factors *gmshn1* and *gmshn9* differentially regulates wax and cutin biosynthesis, alters cuticle properties, and changes leaf phenotypes in arabidopsis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.587-609, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17040587>.

YANG, F. et al. Engineering secondary cell wall deposition in plants. **Plant Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.325-335, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12016>.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable And**

Sustainable Energy Reviews, [s.l.], v. 66, p.751-774, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.

ZAFALON, M.; FREITAS, T. **Em busca de produtividade, setor aposta em cana transgênica**. 2015. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/cana/em-busca-produtividade-aposta-cana-transgenica-060715>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

ZHANG; B. A missense mutation in the transmembrane domain of CESA4 affects protein abundance in the plasma membrane and results in abnormal cell wall biosynthesis in rice. **Plant Mol Biol**, v.71, p.509–524, 2009.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 6, n. 4, p.465-482, 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1331>.

ZHENG, Y. et al. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p.2459-2465, 2009.

ZHONG, R.; YE, Z. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. **Plant Science**, v. 229, p.193-207, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.009>.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

APÊNDICE B - Sequência Genômica de *ShSHN1* com regiões *downstream* e *upstream* do gene

```
>scga7_uti_cns_0289381:1..18813
cgaagggaaatgcatgattcattattcatgcacaaggttcgtgttctttttggatgcaat
gcaatacgttggacattgcaacttttccagccttttttgggctgccaatgagaaatatg
catgggtccgatcaataggccattttgggacctgcttatctgctgcccacactggcacgca
cacttggtgctgacttgccaataatagtttatgaattaataaacagtacatgcctactac
ttaataaagaggtcgatgtccggtacgatcacaaacgaaatcatgtcctggaaattagttc
attttaatttcccactcctaataccatacatagaaaagggttaataagcttcaaactctatcca
agcaagcccttataaaagtcaaaactttccatctctatcactgtatgcccggcatgctctt
gtcgatggcttttttaaaaaagaaaaaaataaaagttacaactggccaaacatgaatgtgt
gctccctcccgaatcaagtggacaccaatgcaaaatacagagtactaccatgcctggcgca
cacacctgcaacgttogaactggcccgccgctgatttttccgagtgcattggagatgg
agatgtagaggagagagatacttggcgagccgagcgagactgagagagcaagagagaaa
cagagacccaggtttgtgtggtggtgactggtgggctagctgtggcgccatggc
ctggcgctgggctgctggtccatccactccacgcagagaaaagctagtatacggttg
gagttgatcccagtgattaaagctagctttattgctgctgtcccagatttgccttgccg
cctcagctttccaaggaaaagataaacaacaaagttaaaaacagatggctagaaagatagct
agaagttgctaggggcaaaaccgtgcaattacggcacagctgaccatatactacttgccct
tctttctcctttcaccaaaccacactttgatgcccagttcagatctactcatctccgcag
agagagtaggacaaccgtactgatgatctttacaaaggacccatgaatgtaaagactgga
aagtgcccactaatagagctcgatcttgtcaacactaataatccatctcctgcaagatg
ccagattagtagactacaaaccttttttttttatcgctccagcctccagggatggccaga
cataccattaatgtcaacattatcatggactggactacaactacaagtaacagactagta
tatacatattctactacacccatgcatgtcggtttgccgccttgagcagattaatctatac
aaaatccaaatatataaaaaaacgaagaaaaaaaggacaactcaagaccaagcagcttcc
ggttcgctaagggtccattattttgaggaaaatggtttttgggagcccagctgaaacttat
ctctttgtccactgcgccaagcaacaaaaataattcagactccaagatgtacctcaggtt
acaggaaactgaggaacagataactgctgcaaacatgcaagggttcaaatacaatccaa
atacagtacactacatgctcctattttttttttactccatataaccagcatttttaaag
atacctttccacaatgtgtgacaaaagggtgtacagtaagtaccagacagtgtcagagga
caagatctcacagaaccttctatgctccagtgagaagtaatcgatcgactgacacatgcc
cgtggagccaggccgtagatgtactgcaggtacctgtttctcattaattgactcaacaag
ggcaacgaacttcatcaatttaattcaccttttcatttcacacagcttaacttctgtagc
aacgggggtggttgctggcctggttaaataatgaccacagctcacgggtttattgcagacc
aacgcttcattttggtatcacaggaaggctaaaggcctagtaccccagtcagcaaatgac
tctgcttagagataggagtgcataccacaatgaaattttcaaatttacatacactacga
gtacacccgttacaaacttattcttttttttttccgaaaaaacacgcctgtgaaata
gagtacgacattccaaagtgtgacttcctaacttatattagcaagcaagcataagtcaaa
accattaagatacttcaaaccgaagcaatgcatgcgaaatgatacttccaaacaaaatg
gcaacaatttttcaggaaagcaccacaaacgggaaagtgcaggctagagcgaacacaaca
ttataaagtgtgcaaaagtggcaaaactgcaaccaaacattttcagcaaaagactccactcca
gctccctttcaaagaacccgaaatcactctgaatgtttggatacagcaaaaggatctagtc
ttattatagacgtgtcaagcttatttgctaaagcaaactaccataaacctatagagctatc
gtcttattaatatatcagctctgttcgcttgggctgaaatctggctgatctgactggtttt
ttgtgagagaaaaacactgctgaatggctggctgatctggctgataatctcaagcgaagt
ttccaagattgacaaaagaaagccaagttcaagcaaaatgaaattttctacaaattaaag
cacatgagttgttcaatggagaagagatgaaattaggtatataaagattactatagccca
acagataacctttttccaacctgatttctattgtgaaaaatattgcaaagccaaatgtaa
aacataactccaaattctcctctgagcaacaattcggtcgactcctatattataacgggtg
tcaggaaaaaaaactattatatttcttcaccgaacaaatatcgatcaactgagcacaca
caccatcgatcaccagcctgtacctgcagctacctcagacaagcttaaatgccacca
actccaagcaattccagagctaacacccccaggacaaaggcaaccttgtcaattctcttac
agatcgactgaagaaatcactctaaacgcagagtctatattcagttaaagaataattcc
ttataaatttcaacatcccattacatattttatattatagagaacaaaattgggtgatgcaa
cacaactagagattccaaatgaagcaaaagaattttggcggttatgtcgttatctcaaaaa
```

tacgcagaaaaatattcgacaccctaagtttcagcacaaagtcttacctatatgctttgtgg
 tgggtgtccatgctgctccagtgggtactcaaccatatgattggccccagtagctctggaag
 gagatcaaggttaatccaaaacagatgtacattaaccctacataaacaactactaagcaat
 caacgactatgtggatcaacctaaggttgccccacaaataaatgtggcagccatgggtgt
 aggtgagagcgtttattaccactgtactagcaggggaaggtggttatgctatgcagacaca
 cagttcaccgacagccacacctgcagacacccatgtggcccccttcagttgccactccc
 ctgatttctctcatcttttgccctatcgctcgttttagattccaaaattcacccccacaaat
 tctactatgcaaaaagaagattcctcatcacatcaaaaataccggcatatatatggagtac
 taaatgtagatgaaattaaaaactaattgcacagttttgtgtactttacgagacgaaca
 ttttgagcctaattaatcaagattttggacaattattaaaaaaaacaaaagtgtacagta
 ttcggggtggcactgtgcaaacctttgccacccccgattcaggcatctaaacgaggcctcc
 tatctcatagttttatccattgacgcacgcttggtatactgctcttggtggccccagcacc
 tgctctccagtcagtgatgcccgccttctccactcccttctctgacaggtatcttac
 tacctagtagctagtagcgcagctaaccacatttatcactcactgcagaagcaagtacagg
 ctgggcagtttatattcactcaaaccagtcctgttcccttccccacacggccacacacactt
 cagttcataggcgccccagcagagctcatctctgctcgtgtgtcctccatgacagagaa
 tctccactccaggaaaaatggtacagccaaagaagtttcgtggagtcgggcagcgccactg
 ggggttccctgggtctctgagatcaggcatccccctcctgtaaggccttctatccctataatt
 ttcagggaagaacataaaactactggtgacaccataattctgaattgcaatgtacgtatat
 ttttgtgatgcgtacagtaagaggagggctctggctgggcaccttcgagactgctgaggag
 gcagcgagagcatatgacgaggctgcccgtgctgatgagcggccgcaacgccaagaccaac
 tccccagtcctaaaggagcagcacaggggagcctaccccagctgcgggaagggtgctcgc
 gccggcagcggtcctctacccgccaacctgtcccagattctcagtgccaagctccgcaaa
 tgctgcaaggcgccatcgccgtccctgacctgtctccgacctgacctgagaagtcaccac
 attggtgtttggcagaagcgcgaggagcccgtgctgactccaaactgggtcatgacctgtg
 gagctcaacaaagggtgcaacatccactgatgttgcatcacagtcacatcagcaacagct
 gctccaccagccacccccgatggatgacgaggagaggatcgccctgcaaatgatcgaagag
 ttgctgagcagcagcagccagcttcaccctcgcatggagatgaccaagggtcgcttcatc
 atctga¹aaaagcatcgatcaaacagcacaaagtcaccatcccagatcgagggttctgctag
 ccggttggttacacaagcagttcaggacttcagggttactccagtaatatagatataaatat
 gtctattactaaatccaacttacaagaactataaagtttgagttgtgtgcagttctatg
 tacttgtgaaaagctctacatacacatgttccctgtcaagatactttgttacacatcaatg
 tcagtgatataattgcttataaaaggaaataaatagattatgattgtgttactattcattc
 tttgcttggtatcctgatgtcaaaactcagttgagaaatctcaacacagttctaaaaaaaat
 atagagagtagagagtccttaatttattttcttcaaacgaagaaccaagggtgaacaaataa
 atctcaaacagggatgaagggtgatgtttgtgtataagacctttacttttatgatagaatg
 gtttgaaaggccatgctctatgagatatcatcactatggcatacaagacaaaccagcaag
 tagacaacacatttctttaatcatatcaactaaatcaatcactctagtggaggcagttat
 gcagaaaagagtagaattcagtgaggagaacaagatgcaaatcatttcactaaaaaaaag
 gtatccattagaaactcaaggtttggcaatggttatctgaaaacacacattttggcactt
 ctaacatcatctcgaggcacaaggaatgtggtgtttttggacgtccaattccacatcac
 caggcaccactgaacactaattgagaatagaacatttaaagataccctcttctgccaatc
 ttgtattaatgaataggctctatgttcagcatcatgtaaccatcacaaagctctacaatgtg
 gacgtagagatgcacaggggtgagagcgatgaaccagtgatggaccatcaagggtgtgca
 acaaacactttaaaggcccttaagggtcatatttctcctcattaaataagcaaatgtaata
 atagatgattgataatcatgataggtactacagacaaatgtcttaatgaccagcataac
 atttgccatcagactaggaacaatcaatattcagggtctcagaattttggcatctggctcc
 agtatcccatggcggggaatcagagttacaataccatgccagaattgagggtcttcatgtgc
 tgtttcatcttgaatgcataatgatcttaaattattaatgatagaagatgaggggggtctt
 taaaccttgataaaatataaaatacaaaagataatataacaacacaatctgttaatccactg
 gaattttcacacccatacaaggaccagattattattttcgagcatcaaaacattacta
 gaaatagccacaagaaagtcctcatcacatgtcattatgacctaaaaggcagccatacaat
 tagatacattagtgaaaataactgacattgtggtgcatccaccacagtggttagtaaaccc
 atgatcagcaatcccttgacatcaagaacccctaccaatttgtgtttaaggaggaccttag
 gtcctcctgggtttggctagatgggttttagtttatttttctgtccccccccccccctcctt
 gtaagtatgtaaccaccttgtgtttatatttataaaaatcactgtggggaactccccaaa
 gtctttggcggttcagaaaaaaaagaaccgctaccaacttgtatcttagcagggatgcaaac
 atgacaatggcaagtcaaaaagaaaagggtcaaggttagccctatgagtgaatagataaca
 agttaacaaaagaaagacaaaagtaagtggtctattttctctccagaactcaaagagcaga
 cagccaaaaaagcaattatcagctccatgggttgattttggaggttggtgcaagcatgca
 gtcaatgctaagggccagccaggttagttggtcagtcgcaatgtacgattgtattagaga

agaataaaacagaaggaactagattcctgccatagttgatccatactgagttgtgtgtc
 ataacataactaaatagcaacttttgaggcctgaaggtctgtcatttttgagagactttctg
 gatagctacataaaaagagctgagttatttcaagatagttaagatgcttgttttatatcta
 gtccttgtctacactgtgaagggttgaaaggtaatggactatctccattttttgttccac
 ttttttttctacaacggctcgagccgaatttcattaccagggagtaacaaaattacaagag
 tttagtggagacacaaagcagtttggacactgaaacaaaaacgccgtcacctccgaacacc
 aaggattcagccgattagggactgctaactgtggaagagaaaattgttcccactacttat
 gtttatctcaatcacatgtttcatatgaagttatgtttgataacttcagttcattcattg
 ggcactagctggttccccttaaaaatttctgtctcccattaccaccattgttatctcctt
 gcaatcatctttcacgccacaacattcgctaaggtaatatcttaacaatgtgcatgtagt
 atcaaaataactcattctgtcattgtgctagaacaaaacagaagaacatgatcttcgagaa
 acagaaattacatgcagagacatgtatcctagcttggtttaggtgaactcatccttcaaa
 atttaagaagatgggtatctatgaattgtcctcgtcacttatataatccaaactgatcg
 aaattagtatgtgcactgcatgggtataaaagctaataatagacaattttataattaagaa
 tttggtagaaacatgccgtgcatccagcaccaatagtataactataacacagacaatatgt
 aacatttgatgggtctgaccataaaaatttacagggtatgacatgaacatctccaatttttct
 gctattctgtttctgtgctcgataatttctgtgtaccacattagctgggttaagggaacttct
 atgatgcaaaagcatgcattgaatatgtccagcaagatagctgtagtgggtcccttaacat
 taactcaatcctttgcatctatcctattcaaatagaccagtgatgtcatcttaattaaga
 ttgcgaagcacatcatattaacttattcattttgtgatgggtgtgggtcttgtcatacacta
 gatctacccagaatgggtttaataaagatcaaatgaagtacgttttaattaattaacag
 cataccaagggtaaacatggtagaacgtttctgcaattgtaaagggtatattgtacatag
 aaactatagcttgtggaacagaaaaattattgaatgttgcaatagttagaatgaataatat
 gttctacctgctaatttgttattccactgaatcttttatttttttgcactcaaactatt
 gctagtaacctttccaaaagcatgttgcatcagatacgcagggagtgaacagaatatgaa
 taaaaagatagcgattgaacattcacataaaggagtaaaattggatgcaaaaaaagggtt
 acagagtgtgggttcagctatattttccagcatagttacttctcatcaaatgttatatt
 gtcagattcagagcagcatctttggctaccaatgagctatggacagtttaccacccata
 tactagacatctggtaaggggcaaccactagagcgtaagatccaacctgcccctttgagta
 gggatagggtactgcagggtccacaacatagtggtcctgaagtactttctaacttttcgtga
 tggttaatttgtttattcagatcagcatacacctcactactcttatggaattgtacatgg
 aacattcaacccaaaagcacataaataactttcagttttcagtaatacagcactattccgat
 ttgaatctccctttgccaatataacttaataaataaactcaggaggtgaaagaatatct
 ggtagcctacaagatataataaagctaatacgattttcaatccaactacatgtccatttga
 ggataaaaaaactagaggcagcagcaggaaggtcaactgtatcatatgcatttgactta
 ctttttattgaactttataatgtatcttgtttatgtttcttgatgaattgatctcagac
 tgtcagacatcatgcattgagaaataatcttgactgtttgcccctgttgggtctgcgaa
 tgctgcaaattcaggaatagtatgaactctagagataaccaacttatccttccggtagac
 aaacgggttgaaaagacaggttccagataaaacatgcaaaaacgtcatatttcatttcaaga
 aagattgagagcaactcttttacacatgttggtcaagaacgagacctagaactcaatttt
 ctcttcctctcgctaccaacataaacaccagctgtatatcttgaatttgaagttcccg
 ggtatcggggctcctgcagtcttcagaacctgaacaagctctttgaaaatccttctatcc
 tctcattcacaaacacaacagccataacctcctcaccattcgagatgccctaccaact
 tggatgaatatattcatcaatggaatttgggtatgtcaacaatatcacttgacgtacttc
 aggatccattccacgccccagcagcagcagtagaacaatgacagatacttctcctgtc
 aaaaaccttctcaaatctctctctctctcttctcctcctcctcgcctatggatagaaacg
 acctctaataccaatagcaacagtaattgcttcagacaacagatcagctccaactctggaa
 ctcaacaacacaacagcagggaggtttaaaatgttgcttgccttttcattatctcaaaaatc
 ttctgcttcttcttctttagactccacccaaatgaccacttgtttaactgatttgggtgg
 ctgtttgggttcccacaagagatacttatcacattcttagccagtgagttagacatcttc
 tcaacttctgaatgtaatgttgctgaaaacatcataacctgtgggtgtgaaagtgaagta
 aaaatctgcatggcctgatccctgaatcccctctccagcaagcagtcacctcatccaaa
 acgaatacagaaacataggttaaggtaaacattgtgtttcatgagaagatcaattagcctc
 ccaggggtcccaacaattaactcaataccattttcaattctgtaaatttgctgagggaat
 ggatctccaccgacagctagagcagttttgaaaggcaaacctttaccaagcacttttgct
 tgctcttctacctgcaggcatagctctctagttggagcaagaactatagccagcggctct
 tgattgcttgtgcattcttgtgatcttactcgtgaacaatgagcaattatgggaattaga
 aaagatgcagttttccctgaaccagttctcagcagaaacaagtaagctcctattactcatt
 gatgcagggataacttgcattctgcactggagtaggcatacaatatcctgcagttctcaaga
 ttgtgcacaagcttctcaggaagaccacatgcagagaaacacatgattggatcaggaaca
 gcatcacccttgacacaaatgtcaagtttactcctcagtgaaactgatccggctgtcagct

aaagtaggtatatttggaaaattaatgtccttaatacagaagctctcatctcccagagga
 aggttcacacgctgtgctgcttttactgctggctttgttttagcagtgatctgaacaaga
 agaattgtcttgcattccacactgcagatgtcatcatcagtcctgatcacatatgtattca
 ccataatcgccacacacaacacagcgaggtctcccaggaagagcttctctctgctcaaag
 catctttccttcacaggtaaatctgcaagtaacatatatgagggaaaagacattgatatc
 tgatcgaaatgcacggaatagacataagacctgcataactagcagccaaaacataaaaa
 acggccatcagctaaaaacagtgagccagcagggacaggagatttcattatttggctcttg
 acctgctaattactgaacatcaagtcaagaagggaagttgcagctttactacatagtttta
 aggaccataaatagatctctgtaaactgtaaacaaaatttttagtgccatgcatttttctt
 tgttgtagagtttttccctcatctcgtttctgtgtaatatatgtgttcacaatgatgtgg
 gatttagagaaacgtgcagcaaccaatccagtacaattaccttccaactcattattatcc
 gatgatgaaacaacaagattatcagctgatttggttctccccttgctccattcagtcacag
 aaggaaaaaaagcaccagtcactgcagagaggaaaggacatatgatcatctcagacac
 ctcaaacattaacacctcaaacattaacccaaccaatatttaggaagcggctaaatgtta
 gatcataatttccaagagaaaacatgaaatttcgacaggggttcaactgctgtctataatct
 gtattgtacgagtggaatacgggtttaagttaaagcacacagctcgtcaccgcgaactcg
 tgggtcgcaacgctgccacctcgacggtcacggtcaaagcgccacggttcgagcctt
 taccgcccctagggtttggagttgagggcggaggcaccggggggcggaagcgctcctg
 cttgcccgcgagggcgcgggcgagcggttctgagggcgttgccgcaacggcgcgctc
 cgggtgagatcgagggccccccacacacaccgacctcgcccgctcggtgctgatttcccgcaa
 agggccctgcccgaactccgcttcaaccaggcagagaggtaggctcgcccctgcaacgc
 ctgcggttccggaatccggatcacggtgcggcgccggcggaagaaggtgcgctcctgg
 tctgcggcgtgctgctgcggcggtgagaaaccacgcacgaggaggatgggtgggcctgttg
 tttcgaaaggccgtatggacggaagtggactgtacctgatgggccttttgcgctgttgca
 gtgtggatcgggcattgcttgactataggtcgtactactatttgagcctgtgttctattt
 ttcgtgggccaagtgaagtcaagtgaatgttttcggtttctctcccggttttttttctc
 cttttttctctgatgactataactgagtacattacaccatgagaaatagtttcacata
 ttacatttttgcataattgtttaactatacatatttatagtaatcgatagtcgaagtataa
 atgtttgaattagaataaaaactagaactacaaaactttatgaaacgggaaagtactatatt
 tgcataatgtacctattccagggtcaatatatttgcgtgatctaactatgtcccagtt
 tttagctgaaggggggaaaaagatcaaagggtattaagggtatgatgtgatgtgaatatacca
 aatgctagtgcggtataaccaggaccgaagatggctcgctatcagttgtactgtttcagcg
 aagggatagtattttttttccacaacaaatcagcgaacagtacttttcagtcctggcttttt
 agtaaaatgaacagggcgctcgtgaaggatggaatgaaatagagtgtggcgaagttaaaat
 taaaatgtaaaaccattagtcgtgtaccaaactcgtcgtctctctcagctccctagacttgg
 tacctactgtcacggcgaccacccatgcaaagtcacataaatcacagtgggtgttggtgg
 ctgtttggcatagctcatgataacttattgtcaaatacttatttctagaacagcttcag
 ggtgaagttgtttttctcttctctcacaaagacatgagttgagatgaagctgaaaatag
 tagcttatcccagctctttcccagctctcccctcatgagccgttggtgaagcttttttgcta
 aacacttttttaaaaacagctcagtttactaaaagagctgcttgtaaagatgttttttca
 aaaaaaaacagtttttagtagtgaaagctgagttgtggcaaacaggtcatatatcgttttt
 aaagctaactcactacaagtctatcttaacatacaagccattcacatcatgaccact
 aattattcacatcatcttccattaatagtcatgtcatagatatcctactaaacttttaaac
 ctcataatacaagctatctacatcatatccatttaatttcatttttaaaatttttgaatc
 tccgcagcgcgcatgaaatatcttttagttataagatatagctgtgatgggtcaaaccat
 gaagaaacggcatcgaaagacatttgtgtacgcccgcgcaaaaactccaggtaggagcg
 gtagaggctctgcgttttagccaaatcgaaaactccaggtagctctgcgtgactgcgttt
 tagccaaatcgctgcgttttagccaaatcgaaaacgcagagccgtagagcccatcatctt
 gttcgtttcacaagactcatagttcccacagagaatatgcaacgattcaacgaacaaggta
 ggtgcccgcggctggctggctatcaacatcaacgatccctgtccttcggaggccacgttc
 gcggtcccgtttgcttcacggatcgaaacagctgcgcggtttgcccggatgacaagaccg
 agtggcagatcatttctttgcgcgatcgtttgtgtgcccagagataggcgtgcgatat
 ggcggatgcaacaacgcagtggcagtaaccaatcaatgtatcatcatgtgacagtgtagc
 cgatgctatcacttaaccgttcattgaaattcttctacacatcacagtttgaatctctta
 agaaaaatgaaaatgagatcaaataaatccttgagcattttggcataatccgtccctttac
 gattacgaaggaagattcataaaaaactcctctgtctaagtcacccgtagggtgagaaaa
 aagagaataaattctatacgacaccgtcacacagcacctatgtacaacatcctattattg
 ctcgacatatgtctctaggtcccaccaggcaagcaaccgccagtggtgtgcggttgagcc
 gagcccgcatttttcatgaaccagtaaatccaaaactagcagatatggcacatgttacacg
 atgagaggatgttgacgctggtgtgtgacagtggtcacatagaatttatttttcaaaa
 aaagagagttttaaggacctcctaaggtcaaaaagagttaggaccaaacctcaaccttgag

gtatcttcttaacgcttaaaaaaattagagttgtgggagaaagatgtgcctaaactcggg
 ccagagctccggttgcgactaacggcgatgccaaaggccgccacatgcatggtgaccaagct
 agttggagtagagtagagcaggtaaacaagagcgacaacaaagggcggtggccttgtgcgg
 gtggacgacaactcttgccgacgagatctcgctctagcagtggcgaaagaggatagggg
 cgggtgggggaggggtcaagaggggtgggacaataacgaggagagaaggttacgctgagaat
 tcgagaagagaagaaaaagaggacactataatttttatgtgtaatatatatgtgggtctat
 tcgacctacgtgacttttttattatataagggagaaaagatctcttcacatataggtcacia
 cttaaagactaaggttgccacacacatcacgagatactctaaaagatgtctagaatttgt
 aagtgtatagtagaaacacatgtgaaataattgtgtgttgcatgtgtgtatcacatggca
 gagaagcatatgtgtcatttttttaattgtgaaagactatttagggctcaaccgctttact
 tggcaagtgtgattacataaatttatcggttttttatatataaaaaaggactgcgctgattga
 cattgtgcatgtactttttcagcacatccgacacaaaaagtggactcacttgacctaaagtga
 ctgactaaagtatccagaaaaagttgacctatctaacccttttttcgccgagatctcga
 agacctaacagcatacgagaactcgtgagaactatgaacataattccacattccctttt
 taaggaatctttgagagtacaccaaactatcactttcatcccaccaacatcactgtctcg
 acaagcaagagcctgcgtctaagtcaacttgactaccttactcacgcgaccgcggcgccg
 gctgccggttcgccgcggccggagctgcactgtgacgcgatcgccggcggtggccatcgc
 cgaaaggatccgactcgccgcggccttgctgaaacgcctctgcctagcttgctccgctc
 gacccccggcatcggcataaccagtcgcgtgccgacgtgtggagatgcttcgttgaatcat
 tggctttgttctgttgcgaggatagtgagagtgccaaacggcgccaggggatcggaggg
 gagcgcgcaaagatgtttctctcgctgcgagagaagacacggtcggagggaaagaggagg
 ggtggggggcatcgactggcatatccgctctgggtattggatattcgttcccccaaatgg
 aataatgcttggaatcttccgtgtcctggcctgtagtagtgcctggctttggactttgggt
 ggcatgtgaagcctcgaatatgtcaagcgtacccagtggtcgcataacttattttgcat
 ggaccttctttggacattctcaacagttcaatagttcatggcacactgattttttttctc
 actccaataaaatataacactggataagtagttgtcatggctactatccccctaaattcaa
 gaggaggcaagtttgctgcaaattgtagtggttaaactagcaggggccccgtgcaaagcac
 gaagagtgttttttttttttttttttttcttactggaagaaggaggggagaagggaagg
 gaaatgagaaaaccgtaacgtgctaggtactgttcatgagcccggttggcgtagatatagga
 ttgggggtagaccatggtagtctcatgacggggtaggtactgttcataagactcggta
 gggcactattcataaaagacctgctactgtacataaacgggtgatgtattgtttatagaacc
 ctggtactgtgcttaaaacagtaaatgaacagtgatctgtgagaggggtcggttccaccaa
 cttttatataatagtcagattcttcaaagaagaaacgtgggtggagattggagaagtagc
 tctgcgtacatcatctcatctggcgttgaagatcgaagtagaaacgcgtggcaatcaaa
 tactccctctgttctgtttgactgtcgtttttggcagtggaattcaatgtccacgttcac
 agcccttggaagcatctggacagacctagtaccacgttcacagagattcaaagtgtatc
 tgctaaaatgccaaagcgacacagataaaagggacagagggagtaataaagggtcaatggca
 cctgcatcagcattattgattgggccatgtgagagagtcgcacatggaatgaagttttct
 tcatctgctcaactctgcctgattaagaaaatgtgtcttgtcgtattaactcaaaacaata
 atgcagtcattatttatgcaagtgccaagaaatgtagtaaattgtgacagtgcacatgtg
 aggagtagggtagtctcgcgacgataatttcgtggtaaccttcggatttggatcgagtattg
 gtttaagaatacगतatagगतatcccatagaagctttcaacattgttgtctacaatgtg
 gagaatggcattattctaagttgtctcccaagttggggctaagctaataaaagccaacca
 gctaaaaactaagaaactactaaatcccttttctcatcagtagctggttttgcacattgg
 accaagaccaatacgcgtatttttaattagcaaggacatacagggacaacgatgggtcct
 ttttaattgagattaccagtttttaagtaactaatttgtttatttccgtattatcgttgg
 gtaaaaaaaatccgcattgacatttagttgatagcatgttttgcgtgagctaaacaagcag
 agttctcacacaaaaataaaaaatctctaaccaattatattttataaatcgaaacatgtatc
 atatgagccaataagctaacaacacataatatatgatattgttgtctcagaaagttgaaa
 agtccaaacatcatattgtatcaaaaattcatgacgaagagcaaaagggatgttgagacct
 acaaaaagtccgcagtcgaagatcaatagaaaataactagtgcccttcaatcttattttctt
 tttgtctaaaaaaagggtcataatttttctatttttagaaaactttggatgcaagtcttcaa
 tgttcttttagataactacaagtcttaattcattgtgtgctcagctccctcgtgcaccgttt
 ttatgttattccaccggtttgaattgcataagttaacaccccaagttcgaattgattagt
 tttgtgccaccatgttcatccctgtgaagtttaacaaagccaaaatatgatgtcattttta
 gatgtaatagtcactctgtgtaagggttagtctcagtttcaatttcttgtgtttgggct
 actaaaagagaaaagtcagtgtatcagcttgtctgttttaattgaagtagttcatctttctgca
 agtgttctttgtttgggtgcacaagatatgtgacctgctacggcccttataggagaaat
 ctctatcagtacattcccattaagccttgagtgtggcatcccttgggttcttttatttac
 tctacacttaaatctcttagactcccattgtttcatgttgagttgcagtgcagtactacattca
 gggtagatttatatttatcatgcatggccttcaaattgtgaagcatgttggcctgtcacgac

ccagttcatgttatctttgcttttgccaatcatcgccacttttacatttcatgtcatcag
agctgctagtcctatttccaaagactcaacatcaactacacaacttattacaatatagcc
ccctttatagtggtatgaaaaatatcatgtttcatgtattttacctatgaaaacaaactaa
ttcctatgaaatTTTTGTACAGCTCCTATGAAATTCCTACGTCCCAAATGGAAAAGTGA
tatgtggatgttaaaatccgtgtttgagcaatttggtatgtagcttgaggtattggtcttc
cacgcctcaataattggagtaaggccctgtttggcagggctttccagcggcttcaggag
ccgtttggagccgttttctgccaaacagggtaaaaataaaacagcttcaccgatggagccc
ctaaaaacatgctctcacagagctttaggggtgggaaggagccaaaaatagtggcttctcc
cagcttcacctcatcatgcatggtgtttgtgagagcatgtttcaagggaactatgcatg
tggagctcttttgccaaacaatttactaaaaacggctctgctccacaaatggagctattc
atggagctgaagcacaaaaaaacggcttcaactggtggagtggagccgtactaaacggggc
ctaaaattcaccttaccaattatagccccagatcaccagatgacatgacctttgtcca
ccctttgggtgcccctagcatttttcctcccaccaaactcaactcatccaaagtacgaa
gccgcgcgtcacgaataaatccgccacatcaccaccccgcatatcctccgttcgtcctcg
tcctcctctgcatccgccccctatttatctctcctctgccctgctctcaacctccccac
actccaattctccaccacgcactccgatcgaattctggtttctcggcgcaaaatcacia
tgaagttcggcaagagcctgaacaaccagatcg