Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Genética

Caracterização do Fator de Transcrição ShSHN1 de Cana-de-Açúcar e Sua Relação com a Biossíntese da Parede Celular em Plantas Transgênicas de Arroz

Alexandre Palma Boer Martins

Orientador: Profa. Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Genética Geral

Ribeirão Preto - SP - Brasil

Outubro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Boer, Alexandre Palma Martins

Caracterização do Fator de Transcrição ShSHN1 de Cana-de-Açúcar e Sua Relação com a Biossíntese da Parede Celular em Plantas Transgênicas de Arroz

155 p. : il. ; 30 cm

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Genética Geral Orientador: Profa. Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

1. Fator de Transcrição. 2. Parede Celular. 3. Cana-de-Açúcar. 4. Biomassa 5. Etanol Celulósico

Dedico este trabalho, em iguais proporções, a todos os acadêmicos e não acadêmicos que contribuíram para minha formação intelectual e, sobretudo, humana.

" Vivemos em uma época perigosa. O homem dominou a natureza antes de ter aprendido a dominar a si mesmo "

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, toda minha gratidão pelo eterno aprendizado, dedicação, confiança e paciência, que muito colaboraram para minha formação acadêmica e pessoal, e também pelo exemplo de determinação e ação em prol da ciência.

- Aos amigos e co-orientadores acadêmicos Dra. Paula Macedo Nobile e Dr. Michael dos Santos Brito pelos ensinamentos, discussões, companheirismo e dedicação plena no desenvolvimento e conclusão deste projeto.

- À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman pela oportunidade e confiança concedidas durante meu ingresso na vida acadêmica, e pelas constantes demonstrações de altruísmo e suporte intelectual.

- Ao Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas da Unicamp (LaFiMP), sob a figura do Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela contínua colaboração e suporte experimental durante o desenvolvimento deste projeto. Em especial à Juliana Mayer, Juan Pablo Mortillha e Eduardo Kiyota pela dedicação e auxílio na condução dos experimentos.

- Aos meus pais Carlos Boer Martins e Letícia Maria Palma Boer Martins, pelas contínuas demonstrações de apoio, carinho, amor, respeito e confiança, durante todas as fases da minha vida.

- Á Juliana Maria de Lima pelas constantes demonstrações de amor e afeto, pelo sorriso sempre aberto, pelo companherismo incondicional, pelas discussões científicas e humanas, e por optar partilhar sua vida a dois, afinal a felicidade só existe quando compartilhada.

- À CAPES, CNPq, FAPESP, Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Centro de Cana (IAC) pelo apoio financeiro concedido ao Laboratório de Biologia Molecular durante o desenvolvimento deste projeto.

- Aos colegas de laboratório: Fernanda Raquel, Izadora Pastore, João Manechini, Larissa Andrade, Letícia Melloni, Lívia Leite, Luiz Fernando Alves, Maicon Volpin, Natália Melloni, Natália Takahashi, Rafael Peixoto, Thais Monteiro e Willian Cursino pela ótima convivência e pelos valiosos momentos de aprendizado e ajuda compartilhados.

- Aos meus eternos amigos Ana Durvalina Bomtorin, Carlos Eduardo Alves Pereira, Claudia Thalita Ribeiro Bizanha, Daniel Martins Coelho, Fabrício Lins, Guilherme Cintra Maranha, Gustavo Togashi, Igor Pogetti Junqueira, João Lucas Barban Ruiz, Jõao Zugaib, Manila Sakamoto Peixoto e Rogério Oliveira Faleiros, meus familiares por opção.

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	16
1. Revisão de Literatura	17
1.1. A Cana-de-Açúcar e o Melhoramento Genético	18
1.2. Biocombustíveis	21
1.3. Parede Celular	24
1.3.1. Celulose	27
1.3.2. Hemicelulose	28
1.3.3. Pectina	29
1.3.4. Lignina	30
1.4. Regulação Transcricional da Biossíntese da Parede Celular	33
1.4.1. O Fator de Transcrição SHINE	36
2. Justificativa	38
3. Objetivos	41
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. Material e Métodos	43
4.1. Material Vegetal	44
4.2. Análises de Bioinformática	44
4.3. Desenho dos Primers para a Amplificação do FT ShSHN1	45
4.4. Extração de RNA Total	45
4.4.1. Quantificação do RNA Total	46
4.5. Reação de Síntese de cDNA	47
4.6. Amplificação, Clonagem e Caracterização da Sequência ShSHN1	48
4.6.1. Amplificação da Sequência ShSHN1 a partir de cDNA	48
4.6.2. Subclonagem do Fragmento ShSHN1 para Seguênciamento	49

4.6.3. Análises das Sequências de DNA dos Clones Obtidos
4.7. Construção do Vetor de Superexpressão em Arroz
4.7.1. Recombinação em Vetor de Entrada pDONR 22150
4.7.2. Reações de Recombinação Múltipla53
4.8. Localização Subcelular do FT ShSHN157
4.9. Transformação Genética de Arroz Mediada por Agrobacterium
tumefaciens
4.10. Confirmação dos Eventos Transgênicos de Arroz
4.10.1. Níveis de Expressão de ShSHN1 nas Plantas Transformadas (T $_0$) 60
4.11. Estimativa do Número de Cópias do Transgene61
4.12. Obtenção da Geração T ₁ e Análise de Segregação $\dots 63$
4.13. Análises Biométricas das Linhagens Transgênicas ShSHN165
4.14. Análises de Expressão Gênica do Transgene e de Possíveis Genes Alvo
do FT ShSHN1 por qPCR65
4.15. Análises Histoquímicas
4.16. Determinação do Conteúdo de Polissacarídeos Estruturais da Parede
Celular
4.17. Determinação da Quantidade de Lignina (Klason)69
4.18. Determinação da Porcentagem de Sacarificação
5. Resultados e Discussão71
5.1. Caracterização do FT ShSHN1 e Análises de Bioinformática
5.2. Amplificação e Clonagem da Sequência ShSHN175
5.3. Localização Subcelular do FT ShSHN178
5.4. Transformação Genética de Arroz via Agrobacterium
5.5. Confirmação dos Eventos Transgênicos ShSHN181
5.6. Aclimatação dos Transgênicos em Casa de Vegetação82
5.7. Nível de Expressão de ShSHN1 nas Plantas Transgênicas em T $_0$ 83
5.8. Estimativa do Número de Cópias do Transgene ShSHN185
5.9. Obtenção da Geração T $_1$ das Linhagens Transgênicas de Arroz e
Análise Genética Quanto ao Padrão de Segregação
5.10. Escolha das Linhagens Transgênicas para as Análises Biométricas
Moleculares e Bioquímicas
5.11. Perfis de Expressão de Possíveis Genes Alvo de ShSHN190
5.11.1. Genes do Metabolismo de Lignina

5.11.2. Genes do Metabolismo de Celulose e Hemicelulose
5.11.3. Genes do Metabolismo de Cera/Cutina
5.12. Caracterização Biométrica das Linhagens Transgênicas ShSHN195
5.13. Análises Histoquímicas
5.14. Dosagem do Conteúdo de Lignina99
5.15. Determinação do Conteúdo de Polissacarídeos Estruturais da Parede
Celular
5.16. Determinação do Percentual de Sacarificação103
5.17. A superexpressão do FT ShSHN1 em Arroz Atua Negativamente na
Modulação de Genes da Biossíntese de Lignina, Reduzindo o Conteúdo e
Aumentando a Eficiência do Processo de Sacarificação105
5.18. Linhagens ShSHN1 Apresentam Ganho de Biomassa, Aumento nos
Parâmetros Biométricos e Conteúdo de Pectinas da Parede Celular107
5.19. ShSHN1 Atua Como Modulador Transcricional de Genes da Parede
Celular Apresentando Potencial de Aplicação no Desenvolvimento de
Matérias Primas Aprimoradas para a Produção de Biocombustíveis
6. Conclusões
7. Referências Bibliográficas114
8. Anexos

9. Manuscrito	1	47
9. Manuscinto	······ ±	.42

RESUMO

O melhoramento genético de culturas com elevada capacidade para produção de biomassa, como a cana-de-açúcar, apresenta grande importância no desenvolvimento de matérias primas que possam ser utilizadas como fonte renovável de energia. A biomassa vegetal possui grande potencial para a produção de etanol 2G, contudo a lignina, um componente estrutural da parede celular vegetal, dificulta o processo de sacarificação e obtenção deste biocombustível. Para superar esta limitação, muitos genes têm sido identificados e utilizados para alterar o conteúdo e/ou composição da lignina, bem como de outros constituintes da parede celular, através de engenharia genética. Dentre eles, alguns fatores de transcrição membros do clado SHINE (SHN) têm sido considerados alvos promissores recentes. A fim de se avaliar funcionalmente o FT ShSHN1 de cana-de-açúcar e sua possível relação com a biossíntese da parede celular, este gene foi isolado e superexpresso em arroz (Oryza sativa), uma planta monocotiledônea modelo. Para isso, um vetor de transformação genética foi construído utilizando o sistema Gateway de recombinação - contendo o promotor constitutivo Ubi-1 regulando a expressão de ShSHN1 - e calos embriogênicos foram transformados via Agrobacterium tumefaciens. O DNA extraído a partir das plantas regeneradas em meio contendo higromicina foi purificado para a confirmação dos eventos transgênicos por PCR. A expressão relativa do transgene e de possíveis genes alvo do FT ShSHN1 foi avaliada por gPCR e o número de cópias estimado por Tagman $^{ extsf{B}}$. Linhagens transgênicas com cópia única foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a analises biométricas, bioquímicas e moleculares. Além disso, a localização subcelular de ShSHN1 foi analisada por expressão transiente em células de tabaco utilizando a detecção por GFP. Como resultados, a fluorescência da GFP foi observada exclusivamente no núcleo das células transformadas. Além disso, foram obtidas 12 linhagens transgênicas ShSHN1 em arroz, das quais três apresentam níveis de expressão elevados, sendo selecionadas para caracterização funcional (6A, 19A e 20A). As análises de expressão gênica de possíveis genes alvo indicaram alterações nos padrões de genes de lignina, celulose, hemicelulose, além de cera e cutina, nas linhagens ShSHN1. Complementarmente, as análises biométricas revelaram um aumento no crescimento vegetativo das plantas, com acréscimos significativos em parâmetros como número total de perfilhos, altura máxima da planta, comprimento e largura da folha bandeira, além de um incremento em até 50% no conteúdo de biomassa seca quando comparadas ao WT. As análises dos componentes da parede celular indicaram a redução na quantidade de lignina total em até 40% e um aumento na quantidade de pectinas em até 200%. A eficiência no processo de sacarificação também apresentou uma melhora significativa com valores até 50% superiores em relação ao grupo controle. A diminuição no conteúdo de lignina, o aumento da biomassa, e a maior eficiência no processo de sacarificação aqui obtidos, evidencia o grande potencial de estudo e aplicação do FT ShSHN1 na pesquisa e desenvolvimento de biocombustíveis como o etanol 2G, abrindo novos horizontes para a engenharia genética de culturas energéticas como a cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The genetic breeding of crops with high capacity for biomass production such as sugarcane has great importance in the development of feedstocks that can be used as a renewable energy source. The biomass has great potential for the production of ethanol 2G, however lignin, a structural component of plant cell wall, impairs the process of saccharification and obtaining of this biofuel. To overpass this limitation, many genes have been identified and used to alter the content and/or composition of lignin and other cell wall constituents by genetic engineering. Among them, some members of transcription factors belonging to SHINE clade (SHN) have been considered recently as promising targets. In order to functionally evaluate the sugarcane FT ShSHN1 and its relationship to biosynthesis of the cell wall, this gene was isolated and overexpressed in rice (Oryza sativa), a monocot plant model. For this, a transformation vector was built using the Gateway recombination system - containing the constitutive promoter Ubi-1 regulating the ShSHN1 expression - and embryogenic calli were transformed via Agrobacterium tumefaciens. The DNA extracted from the regenerated plants in selective medium containing hygromycin was purified for confirmation of transgenic events by PCR. The relative expression of the transgene and possible targets genes of FT ShSHN1 was evaluated by gPCR and the copy number were estimated by Tagman[®]. Transgenic lines with a single copy were grown in a greenhouse and subjected to biometric, biochemical and molecular analysis. Furthermore, ShSHN1 subcellular location was analyzed by transient expression in tobacco cells using GFP detection. The results showed that fluorescence of GFP was observed only in the nucleus of transformed cells. In addition, 12 ShSHN1 transgenic rice lines were obtained and three of them, exhibiting the highest transgene expression levels, were selected for functional characterization (6A, 19A and 20A). The gene expression analysis of ShSHN1 and potential target genes showed changes in patterns of lignin, cellulose, hemicellulose, and wax and cutin genes in ShSHN1 lines. In addition, biometric analysis revealed an increase in vegetative growth, with significant increases in parameters such as number of tillers, maximum plant height, length and width of the flag leaf, and an increase up to 50% in the content of dry biomass when compared to WT. Cell wall components analysis indicated a reduction in total amount of lignin up to 40% and an increase in the amount of pectins up to 200%. Furthermore, the efficiency of saccharification process also showed a significant improvement with values up to 50% higher than control group. The reduction in lignin content, increased biomass, and more efficient saccharification process presented here, highlights the great potential of this study and the application of FT ShSHN1 in research and development of biofuels such as 2G ethanol, opening new horizons for genetically engineered of energy crops such as sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais etapas na produção de bioetanol a partir de diferentes matérias primas. *A:* Etanol de primeira geração produzido a partir de sacarose ou amido. *B:* Etanol de segunda geração produzido a partir de lignocelulose (modificado, Yuan et al., 2008).

Figura 2 - Esquema ilustrativo da parede celular em uma célula de xilema. A parede secundária é dividida em diferentes camadas (S1, S2 e S3), cada uma com um arranjo particular de microfibrilas de celulose, hemicelulose e lignina. A lamela média garante a adesão entre células adjacentes (modificado, Stokes et al., 2001).

Figura 3 - Esquema representativo geral da biossíntese e arranjo estrutural dos três principais componentes da parede celular vegetal: Celulose, Hemicelulose e Lignina (modificado, Carpita & Gibeaut, 1993).

Figura 4 - Representação geral simplificada da biossíntese dos monômeros constituintes da lignina (H, S e G) a partir da via dos fenilpropanóides (modificado, An et al., 2015).

Figura 5 - Modelo geral simplificado das redes regulatórias transcricionais que atuam na biossíntese da parede celular. Os retângulos coloridos representam a categorização dos fatores de transcrição (FTs) em diferentes níveis hierárquicos (modificado, Wang et al., 2016).

Figura 6 - Representação esquemática da reação de recombinação entre a sequência <u>ShSHN1</u>, flanqueada pelos sítios attB, e o vetor pDONR 221, contendo os sítios attP. O produto final desta reação é o vetor de entrada pENTR:<u>ShSHN1</u>.

Figura 7 - Esquema representativo da reação de recombinação múltipla Gateway. Regiões específicas dos vetores pENTR:<u>ShSHN1</u>, pHb7m24GW e pEN-L4-UBIL, são recombinadas originando o vetor final de superexpressão pOE<u>ShSHN1</u>. *T-35S e T-nos:* terminadores. *P-35S e Ubi-1:* promotores que regulam, respectivamente, a expressão dos genes marcadores de seleção para higromicina (*hpt*) e para a sequência de interesse (<u>ShSHN1</u>). *RB e LB:* borda direta e borda esquerda do T-DNA.

Figura 8 - Representação ilustrativa dos cassetes de expressão da região codificadora ShSHN1 e higromicina (hpt) presentes no T-DNA do vetor pOEShSHN1. Retângulos Verticais: bordas esquerda (LB) e direita (RB) do T-DNA. Setas Cinzas: Sequências referentes aos promotores CaMV 35S e Ubi-1. Setas Brancas: Sequências codificadoras

Figura 10 - Alinhamento múltiplo de aminoácidos referente às sequências SHN de arabidopsis (At), tomate (SI), cevada (Hv), milho (Zm), sorgo (Sb), arroz (Os) e cana-de-açúcar (Sh), utilizando o *software* ClustalX. Os locais evidenciados pelas setas indicam regiões conservadas do domínio AP2 e dos motivos 'mm' e 'cm', exclusivos ao clado SHINE.

Figura 11 - Análise filogenética entre FTs pertencentes à família AP2 em arabidopsis (At), tomate (SI), milho (Zm), sorgo (Sb), cevada (Hv), arroz (Os) e cana-de-açúcar (Sh). A árvore foi gerada a partir do alinhamento entre sequências de aminoácidos utilizando o *software* ClustalX, com visualização no programa MEGA 5.1. *Maximum Likelihood* (bootstrap = 100). Em destaque (*) encontra-se a sequência **ShSHN1** candidata a caracterização funcional.

Figura 12 - Eletroforese da reação de PCR em gel de agarose mostrando o produto da amplificação da sequência <u>ShSHN1</u>, utilizando os *primers* ShSHN1-F e ShSHN1-R. *M:* Marcador de peso molecular *100pb DNA Ladder* (Bio Labs). *Raia 1:* Produto da amplificação a partir do cDNA da variedade IACSP04-065 (±650pb).

Figura 13 - Eletroforese da reação de PCR em gel de agarose mostrando o produto da amplificação de <u>ShSHN1</u> (±650pb) em 22 colônias de *E. coli* transformadas. *M:* marcador de peso molecular *100pb DNA Ladder* (Bio Labs). *APB-1 a APB-22:* Clones positivos selecionados.

Figura 14 - Esquema ilustrativo dos três tipos de variantes encontradas para o FT ShSHN1. *ShSHN1A:* Variante completa e sem inserções (636 pb). *ShSHN1B:* Variante com inserção de 6pb (642 pb). *ShSHN1C:* Variante "truncada" com a presença do *stop códon* prematuro TGA (628 pb).

Figura 15 - Localização subcelular do FT ShSHN1 e predição *in sílico*. *A:* Expressão transiente em células de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com a construção p<u>ShSHN1</u>-GFP. *I:* Campo claro. *II:* Núcleo celular marcado com DAPI. *III:* Detecção da fluorescência da GFP fusionada à proteína ShSHN1 no núcleo celular. *IV:* Sobreposição de B e C. *B:* Predição computacional utilizando a software Mult Loc.

Figura 16 - Principais etapas envolvidas na transformação genética de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. *A:* Introdução de sementes de arroz em meio de indução de calos embriogênicos (N6D). *B:* Detalhe dos calos proliferados após 12 dias de sub-cultivo. *C:* Fase inicial de regeneração das plântulas a partir dos calos infectados com a solução agrobacteriana contendo o vetor pOE<u>ShSHN1</u>, após 30 dias de cultivo em meio de regeneração seletivo RE-III. *D:* Completa regeneração das plantas de arroz após 45 dias em meio seletivo de multiplicação (MS₃).

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para a confirmação dos eventos transgênicos ShSHN1. *M*: Marcador de peso molecular *100 pb DNA Ladder* (Bio Labs); *Raias 1 a 15*: Plantas regeneradas em meio seletivo; *WT*: Planta não transformada; +: Controle positivo da reação de PCR; - : Controle negativo.

Figura 18 - Etapas envolvidas na aclimatação das plantas transgênicas em casa de vegetação. *A:* Plântulas transformadas e completamente regeneradas *in vitro* após 45 dias de cultivo em meio seletivo contendo higromicina. *B:* Fase inicial de aclimatação dos eventos transgênicos em *tubetes* contendo terra e substrato vegetal. *C:* Plantas de arroz transgênicas aclimatadas com 25 dias em casa de vegetação.

Figura 19 - Perfil de expressão relativa de ShSHN1 em 15 plantas de arroz transformadas com a construção pOE<u>ShSHN1</u>. As barras em cinza claro, cinza escuro, e preto indicam a formação de grupos com níveis de expressão diferencial (baixa, média e alta, respectivamente). Os cálculos foram realizados pelo método $2^{\Delta\Delta Ct}$, utilizando como normalizador o gene eFE1a, e como controle (calibrador), amostras do evento que apresentou o menor nível de expressão (23A - linha tracejada).

Figura 20 - Aspectos do padrão de segregação observado em plântulas transgênicas ShSHN1 resistentes ao antibiótico higromicina, após 7 dias de cultivo em meio seletivo (MS₃). *T6-A, T19-A, T20-A*: Plântulas transgênicas exibindo o padrão de segregação mendeliano para heranças monogênicas (3 resistentes: 1 sensível). *WT:* Sementes de plantas de arroz não transformadas (controle positivo).

Figura 21 - Perfil de expressão relativa de ShSHN1 em 5 linhagens transgênicas independentes em T₁ (3A, 27A, 6A, 19A e 20A). As barras em cinza representam as réplicas biológicas das linhagens que apresentaram os maiores níveis de expressão (6A-1, 4 e 5; 19A-2, 5 e 6; 20A-1, 5 e 6). Os cálculos foram realizados pelo método $2^{\Delta\Delta Ct}$, utilizando como normalizador o gene eFE1a, e como calibrador, amostras do evento que apresentou o menor nível de expressão [(3A-4) - linha tracejada)].

Figura 22 - Cultivo em T_1 das linhagens transgênicas ShSHN1 com seis indivíduos por progênie. Aspecto das plantas com 45 dias em casa de vegetação. Os eventos que apresentaram os maiores níveis de expressão de ShSHN1, cópia única e segregação mendeliana 3:1, foram selecionados (3A, 6A, 19A, 20A e 27A).

Figura 23 - Perfil de expressão de genes relacionados à biossíntese de lignina em três linhagens ShSHN1 independentes. As colunas em cinza claro e cinza escuro representam, respectivamente, amostras de folhas e hastes de perfilhos. Os cálculos foram conduzidos e os gráficos obtidos através da comparação entre as médias amostrais das linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) e do grupo controle (WT), com o auxílio do *software* REST (Pfaffl, 2002). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam níveis de significância (p≤0,05).

Figura 24 - Perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de celulose e hemicelulose em três linhagens ShSHN1 independentes. As colunas em cinza claro e cinza escuro representam, respectivamente, amostras de folhas e hastes de perfilhos. Os cálculos foram conduzidos e os gráficos obtidos através da comparação entre as médias amostrais das linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) e do grupo controle (WT), com o auxílio do *software* REST (Pfaffl, 2002). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam níveis de significância ($p \le 0,05$).

Figura 25 - Perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de cera e cutina em três linhagens ShSHN1 independentes. As colunas em cinza claro e cinza escuro representam, respectivamente, amostras de folhas e hastes de perfilhos. Os cálculos foram conduzidos e os gráficos obtidos através da comparação entre as médias amostrais das linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) e do grupo controle (WT), com o auxílio do *software* REST (Pfaffl, 2002). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam níveis de significância ($p \le 0,05$).

Figura 26 - Parâmetros biométricos e aspecto morfológico das linhagens transgênicas ShSHN1. *A:* Número de perfilhos. *B:* Altura máxima da planta. *C:* Comprimento da folha bandeira. *D:* Diâmetro da folha bandeira. *E:* Peso fresco. *F:* Peso seco. *G:* Aspecto visual das linhagens transgênicas (6A, 19A, 20A) e controle (WT). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam os níveis de significância (ANOVA-Dunnet. * $p \le 0,05$).

Figura 27 - Caracterização histoquímica das linhagens ShSHN1. Cortes transversais de de pedúnculos florais corados com o reagente Maule (**A**) e Fluoroglucinol (**B**). As secções foram visualizadas por microscopia de luz. **WT:** Plantas controle. **T6, T19A e T20A:** Plantas transgênicas. Barras = 20 μm.

Figura 28 - Conteúdo médio de lignina (insolúvel e total) nas linhagens transgênicas ShSHN1 (6A, 19A e 20A) e grupo controle (WT). As barras verticais indicam o erro padrão das médias de triplicatas independentes e os asteriscos indicam o nível de significância (ANOVA-Tukey. * $p \le 0,05$).

Figura 29 - Conteúdo médio dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina nas linhagens transgênicas ShSHN1 (6A, 19A e 20A) e grupo controle (WT). *A:* Celulose. *B:* Hemicelulose. *C:* Pectina. As barras verticais indicam o erro padrão das médias de triplicatas independentes e os asteriscos indicam o nível de significância (ANOVA-Tukey. *p \leq 0,05).

Figura 30 - Percentual de sacarificação nas linhagens transgênicas ShSHN1 (6A, 19A e 20A) e grupo controle (WT). As barras verticais indicam o erro padrão das médias de triplicatas independentes e os asteriscos indicam o nível de significância (ANOVA-Tukey. *p≤0,05).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Primers* utilizados na amplificação da sequência <u>ShSHN1</u>. Nome, seqüência e temperatura de pareamento dos *primers* estão em evidência.

Tabela 2: Primers utilizados no sistema Gateway. Nome, sequência e temperatura de pareamento dos *primers* utilizados na construção dos sítios attB para recombinação no vetor de entrada pDONR 221.

Tabela 3: *Primers* utilizados para checar a orientação das sequências de DNA recombinadas no vetor de destino pOE<u>ShSHN1</u>. Nome, sequência e temperatura de pareamento dos *primers* utilizados no sequenciamento da região do T-DNA que contem a sequência <u>ShSHN1</u>.

Tabela 4: *Primers* utilizados na quantificação da expressão de ShSHN1 por qPCR nos eventos transgênicos obtidos. Nome, seqüência e temperatura de pareamento dos *primers* estão em evidência.

Tabela 5: *Primers* e sondas utilizados na detecção do número de cópias do transgene ShSHN1 por qPCR-TaqMan. Nome, seqüência e temperatura de pareamento dos *primers* e sondas estão em evidência.

Tabela 6 – *Primers* utilizados para a análise de expressão de possíveis genes alvos do FT ShSHN1 em T_1 . Nome, *locus*, sequência e função correlata dos *primers* estão evidenciados.

Tabela 7 - Estimativa do número de cópias do transgene *hpt* nas plantas de arroz transformadas com a construção pOE<u>ShSHN1</u>, utilizando a metodologia por qPCR-TaqMan.

Tabela 8 - Padrão de segregação referente ao gene *hpt* na progenie T_1 das plantas transgênicas de arroz. Teste do X_2 para segregação mendeliana monogênica 3:1 com nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade ($X_2 \leq$ 3,84).

1 - Revisão de Literatura

=

1 - Revisão de Literatura

1.1 - A Cana-de-Açúcar e o Melhoramento Genético

Pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, a cana-de-açúcar é uma monocotiledônea de metabolismo C4 altamente eficiente na conversão da energia solar em biomassa. O gênero *Saccharum* tem como centro de origem e diversidade provável a Nova Guiné, ainda que populações selvagens e híbridos interespecíficos possam ocorrer do Japão até o Mediterrâneo (Roach, 1995).

O melhoramento genético de plantas com grande potencial de produção de biomassa como a cana-de-açúcar apresenta cada vez mais importância para o desenvolvimento de cultivares que possam ser utilizadas como fonte renovável de energia. Apesar de historicamente a cana possuir uma importância mundial como principal fonte de matéria prima para a produção de açúcar e etanol de primeria geração (1G), seu alto potencial para a produção de biomassa vem potencializando sua utilização para a produção de biocombustíveis como o etanol geração (ligno)celulósico, conhecido como etanol de segunda (2G). Características como rápido crescimento, elevada produtividade e baixo custo de manejo são importantes aspectos que contribuem para a relevância desta cultura.

Apesar de sua grande importância econômica e agrícola, a cana-de-açúcar possui uma complexidade genética ímpar (Enriquez-Obregon et al., 1998). Elevada ploidia, baixa fertilidade e um extenso genoma, entre outras características, tornam as análises e estudos genéticos nessa cultura uma tarefa complexa (Gallo-Meagher & Irvine, 2000). Além disso, as variedades comerciais de cana possuem uma base genética bastante restrita, em virtude do pequeno número de genótipos ancestrais utilizados no melhoramento convencional. Elas são híbridos altamente poliplóides e aneuploídes (2n = 100-130) derivados do cruzamento entre a espécie selvagem *Saccharum spontaneum* (2n = 48-128) e a espécie cultivada, rica em açúcar, *Saccharum officinarum* (2n = 80), seguido de sucessivos retrocruzamentos com esta última, além de contribuições de *Saccharum robustum, Saccharum barberi* e *Saccharum sinense* (D' hont et al., 2002; Ming et al., 2010; Altpeter & Oraby, 2010).

Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada em mais de 100 países e o Brasil é o maior expoente mundial, com aproximadamente 10 milhões de hectares cultivados, seguido por Índia e China (FAO, 2015). Além disso, o país é o maior produtor global de açúcar e bioetanol de cana, sendo o estado de São Paulo responsável por 55% da produção nacional (CONAB, 2015). O cultivo da cana é considerado muito vantajoso, pois se trata de uma cultura semi-perene, com manejo facilitado pelo fato de não precisar ser replantada a cada estação de crescimento, reduzindo os custos totais de produção (Yuan et al., 2008).

Após a moagem da cana para fermentação e obtenção do etanol 1G, o bagaço residual se torna um subproduto fibroso do processo. Atualmente, a maior parte deste bagaço é queimada e convertida em energia elétrica através do processo de co-geração (Matsuoka & Arruda, 2009). Além disso, outro resíduo importante que é subaproveitado em termos energéticos são as folhas deixadas no campo após a colheita. O bagaço da cana e suas folhas contêm elevadas guantidades de carboidratos estruturais - principalmente celulose e hemicelulose - que podem ser convertidos em açúcares fermentáveis (processo conhecido como sacarificação) para a obtenção do etanol 2G. Uma tonelada de bagaço residual pode gerar até 300 L de etanol, dependendo da eficiência no processo de sacarificação (Chandel et al., 2012). Devido ao recente interesse por esse tipo de biocombustível, cada etapa de produção está em contínuo processo de otimização em relação ao rendimento e eficiência, voltada principalmente para os métodos utilizados na sacarificação e fermentação, que ainda apresentam-se com moderado rendimento e elevado custo. A tecnologia do etanol 2G em canade-açúcar envolve, portanto, o uso da biomassa vegetal residual advindas do cultivo em campo e do processamento do etanol 1G, como matéria prima renovável extra para a produção de energia na forma de biocombustível, apresentando um relevante potencial energético e econômico (Chandel et al., 2012).

Tendo em vista que a maioria dos esforços direcionados ao melhoramento genético convencional de cana-de-açúcar invariavelmente esbarram na complexidade de seu genoma, avanços recentes nas áreas de genômica funcional e engenharia genética têm possibilitado identificação, isolamento e transferência de genes alvo para serem utilizados no desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas (Vega-Sànchez et al., 2010; Gao et al., 2013). Apesar dos recentes avanços na obtenção de cana-de-açúcar transgênica, a

eficiência nos processos de transformação são consideradas baixas devido à complexidade genômica e elevada recalcitrância das cultivares modernas (Basnayake et al., 2011; Manners et al., 2011; Jung et al., 2012, Taparia & Altpeter 2012; Reis et al., 2014). Além disso, a inexistência de genes plenamente caracterizados para serem utilizados como alvo permanece como um grande obstáculo na geração de cultivares de cana transgênica. Dessa forma, uso de plantas modelo em monotiledôneas, como o arroz, tem se mostrado útil em estudos funcionais de genes que controlam características de interesse (Ko Shimamoto & Kyozuka, 2002; Tyagi et al., 2008; Sood et al., 2011). Os avanços obtidos em relação à cultura de arroz, que incluem o sequenciamento completo do genoma (The map-based sequence of the rice genome - 2005), caracterização em larga escala de inúmeros ESTs (expressed sequence tags) (Kikuchi et al., 2003; Xie et al., 2005; Lu et al., 2008), construção de bibliotecas de cDNA e bancos de mutantes (Nakamura et al., 2007; Krishnan et al., 2009; Sakurai et al., 2011), além mapas de expressão gênica (Wang et al., 2010; Hamada et al., 2011; Ohnishi et al., 2011), contribuem com a ampla utilização deste modelo em estudos genéticos em monocotiledoneas (Tyagi et al., 2008; Sood et al., 2011).

Tradicionalmente, os programas de melhoramento genético em cana-deaçúcar têm focado majoritariamente no desenvolvimento de cultivares com maior conteúdo de sacarose para a produção de açúcar e etanol 1G. Contudo, estudos recentes vêm sendo desenvolvidos visando aperfeiçoar o potencial energético para a produção de etanol 2G. Dessa forma, nos últimos anos, um novo biotipo de cana tem sido desenvolvido pelos programas de melhoramento genético, exibindo alto teor de fibra e elevada produção de biomassa, sendo chamadas de cana energia (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2016). Apesar de desafiadora, a caracterização funcional de genes de interesse para produção de etanol 2G pode acelerar o desenvolvimento dessas cultivares, atuando como estratégia para aprimorar o desenvolvimento desta tecnologia.

1.2 - Biocombustíveis

A busca por combustíveis de origem renovável, em contrapartida ao uso dos combustíveis fósseis, tem se tornado um desafio cada vez maior para os países que buscam uma sustentabilidade energética "verde". A contínua demanda global por energia, aliada à alta dependência do petróleo, e à tentativa de minimizar os efeitos negativos da concentração de gases estufa na atmosfera, impulsionam o interesse e a demanda mundial pelos biocombustíveis.

O termo biocombustível é definido como a energia derivada de qualquer fonte biológica de carbono (Srivastava et al., 2010). Atualmente, diversos tipos de biocombustíveis estão disponíveis no mercado (i.e., biogás, biodiesel, bioéter e bioetanol) e são produzidos predominantemente a partir do sorgo (*Sorghum bicolor*), soja (*Glycine max*), *switchgrass* (*Panicum virgatum*), milho (*Zea mays*) e cana-de-açucar (*Saccharum* ssp). O etanol produzido a partir da sacarose - ou do amido de milho - é referido como biocombustível de primeira geração (1G), e no Brasil, a produção de etanol a partir da sacarose representa a opção mais conveniente e atualmente desenvolvida para a cultura da cana. Porém, para que os biocombustíveis possam substituir ao menos em parte o consumo atual de combustíveis fósseis como a gasolina e o diesel, tem sido proposto que a biomassa, presente nas paredes celulares de resíduos agrícolas como o bagaço e as folhas da cana, seja utilizada como fonte de celulose e outros polissacarídeos para a produção do etanol de segunda geração (2G) (Li et al., 2008).

Todas as paredes celulares das plantas superiores contêm celulose, um polímero constituído por unidades de glicose, além de polissacarídeos como hemiceluloses e pectinas. As paredes celulares das células vegetais são o recurso renovável mais abundante do planeta. Estima-se que a fixação líquida de CO₂ por plantas terrestres a cada ano seja de 50x10⁹ toneladas e que a produção de biomassa ultrapasse 180x10⁹ toneladas (Field et al., 1998). Desse montante, cerca de 70% é representado por constituintes das paredes celulares (Poorter & Villar, 1997). Porém, tomados em conjunto, apenas 0,1% da biomassa contida nessas paredes é atualmente utilizada na produção de biocombustíveis.

Os principais polissacarídeos da parede celular das plantas (celulose, hemicelulose) podem ser convertidos em energia de diversas maneiras. A mais antiga e amplamente utilizada é a combustão direta do material vegetal. O fato de grande parte da biomassa vegetal ser altamente lignificada a torna um combustível de elevado poder calorífico e que pode ser utilizada na produção de energia elétrica via co-geração (Carvalho et al., 2014).

Outro método envolve a combustão e gaseificação dos componentes da parede celular para a obtenção de combustíveis líquidos. O monóxido de carbono resultante da queima (CO), junto com o gás hidrogênio (também chamados gases de síntese), podem ser convertidos em hidrocarbonetos de vários comprimentos, por meio reações químicas catalisadas (método Fischer-Tropsch). A quebra dessas grandes cadeias de hidrocarbonetos pode ser utilizada para produção de combustíveis como o biodiesel e o bioéter (Tijmensenet al., 2002). Neste caso, o objetivo principal relacionado ao uso da parede celular é simplesmente um aumento na produção de biomassa por hectare, independentemente da sua composição (Tijmensen et al., 2002).

Entretanto, uma abordagem mais sofisticada na produção de biocombustíveis tem sido proposta, e envolve a degradação dos materiais constituintes da parede celular em unidades monoméricas (monossacarídeos), que possam ser fermentados para a produção de combustíveis como o etanol 2G (Schubert, 2006). Porém, o grande desafio é que as plantas desenvolveram estruturas complexas de paredes celulares que são recalcitrantes à degradação biológica e enzimática (Pauly et al., 2008; Carrol & Somerville et al., 2009; Somerville, 2010). A celulose disponível na parede celular está aprisionada em uma matriz de hemicelulose e lignina, denominada biomassa lignocelulósica. A presença da lignina, por sua vez, dificulta a solubilização, e os processos enzimáticos de obtenção e de fermentação desses açúcares, comprometendo a eficiência na produção deste biocombustível (Chen & Dixon, 2007; Weng et al., 2008; Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Além disso, a produção do etanol (ligno)celulósico, ou 2G, envolve um número maior de etapas e uma maior complexidade em relação ao etanol de primeira geração (Fig. 1). As principais etapas envolvidas são a coleta da biomassa, pré tratamento, hidrólise da celulose e hemicelulose presente nas paredes celulares (sacarificação), fermentação dos açúcares liberados, e a recuperação e purificação final do combustível (Yuan et al., 2008).

22



Figura 1 - Principais etapas na produção de bioetanol a partir de diferentes matérias primas. *A:* Etanol de primeira geração produzido a partir de sacarose ou amido. *B:* Etanol de segunda geração produzido a partir de lignocelulose (modificado, Yuan et al., 2008).

Apesar do potencial energético oferecido pelo uso da biomassa lignocelulósica, sua conversão em bioetanol ainda enfrenta obstáculos técnicos e econômicos, e uma eficiente utilização da matéria prima para obter elevados rendimentos e produtividade, é importante e necessária (Alvira et al., 2010). Neste sentido, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas que apresentem alterações na proporção e/ou composição de constituintes da parede celular como celulose e lignina (Pauly & Keegstra, 2008a, 2010b; Carpita et al., 2012; Phitsuwan et al., 2014; Wang et al., 2015), representa uma estratégia bastante interessante. Outra possibilidade é a indução da síntese de polissacarídeos solúveis em água - como pectinas e alguns tipos de hemicelulose (Gírio et al., 2010; Fonseca et al., 2011; Edwards & Peterson, 2012; Xiao et al., 2013) - em culturas geneticamente modificadas.

Como visto, a otimização da obtenção do etanol (2G) é uma das características de maior interesse no segmento atual da pesquisa em biocombustíveis. Estudos genéticos voltados ao aprimoramento da biomassa visando a produção desse tipo de combustível podem assegurar ao Brasil uma posição de liderança na área bioenergética, além de colocar a cana em um novo patamar estratégico.

23

1.3 - Parede Celular

A parede celular das plantas é uma característica intrínseca das células vegetais, sendo crucial para a manutenção de muitos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas. Ela confere rigidez mecânica, determina a forma, controla a expansão celular, protege a célula contra agentes patogênicos ou predadores, e participa da comunicação intercelular (Cosgrove, 2005; Zhong et al., 2007; Souza, 2011). A parede celular precisa ser forte o suficiente para impedir o rompimento dos protoplastos devido à pressão osmótica, por outro lado precisa ter propriedades que permitam a expansão celular de maneira controlada (Carpita et al., 1993).

A parede celular é uma estrutura dinâmica que sofre mudanças ao longo do desenvolvimento celular e em resposta às condições ambientais (Blee et al., 2001). É, em grande parte, constituída por uma rígida camada de polissacarídeos complexos depositados sobre a superfície externa da membrana plasmática que envolve a célula vegetal (Dey & Brinson, 1984; Fry, 2000). As paredes celulares são estruturas complexas e não uniformes, que podem variar em sua composição química, forma e estrutura. Classicamente, os constituintes da parede celular são divididos em três grupos: Celulose, Hemicelulose e Pectinas. Além disso, determinados tipos celulares contém um outro componente associado à parede celular, a lignina, um polímero composto por monolignóis derivados da via dos fenilpropanóides (Liepman et al., 2010).

Morfologicamente, a parede celular madura da célula vegetal é uma estrutura laminada com três camadas distintas: parede celular primária, parede celular secundária e lamela média (Fig. 2) (Brett & Waldron, 1996; Popper, 2008). A camada mais externa, depositada ao longo de duas células adjacentes, após o processo de divisão celular (mitose) é chamada lamela média. Após a separação dos dois núcleos celulares durante a mitose, uma nova camada fina é depositada durante os processos de crescimento e elongação das células formadas. Esta camada é chamada parede celular primária e é constituída basicamente por celulose, hemiceluloses e pectinas (Carpita & Gibeaut, 1993). De modo geral, ela consiste em uma estrutura polimérica entrelaçada tridimensionalmente por microfibrilas de celulose e hemicelulose, dispersas em uma matriz de pectinas.



Figura 2 - Esquema ilustrativo da parede celular em uma célula de xilema. A parede secundária é dividida em diferentes camadas (S1, S2 e S3), cada uma com um arranjo particular de microfibrilas de celulose, hemicelulose e lignina. A lamela média garante a adesão entre células adjacentes (modificado, Plomion, Leprovost et al., 2001).

Com base na composição de polissacarídeos, a parede celular primária pode ser separada em dois grupos distintos: Tipo I e Tipo II (Carpita, 1996). As paredes do Tipo I estão presentes em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas. Além da celulose, elas geralmente contêm xiloglucanas como o principal tipo de hemicelulose e quantidades abundantes de polissacarídeos pécticos (Carpita e Gibeaut, 1993).

A família das gramíneas e de outras plantas monocotiledôneas, por sua vez, têm paredes celulares do Tipo II, as quais apresentam um menor conteúdo de pectinas, e onde as hemiceluloses são compostas principalmente por arabinoxilanas (Brett e Waldron, 1996). A parede celular primária do Tipo I é composta por aproximadamente 35-45% de celulose, 25-35% de hemiceluloses e 30-35% de pectinas, em peso seco (Cosgrove, 2005), enquanto que a Tipo II é representada por 25-35% de celulose, 45-55% de hemiceluloses e 8-10% de pectina.

Durante toda a fase de crescimento, a parede celular primária é continuamente depositada no interior das células vegetais. As paredes secundárias são depositadas após a fase de elongamento, cessando o crescimento das células. São geralmente mais espessas do que as paredes primárias e podem ser depositadas em camadas S_1 , S_2 e S_3 (Fig. 2), onde cada

camada é composta de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes proporções (Plomion, Leprovost et al., 2001). Este tipo de parede geralmente é sintetizado por células que requerem grande força mecânica e um reforço estrutural, como em feixes vasculares e fibras (Cosgrove, 2005). As paredes secundárias contêm além de celulose, os açúcares arabinoxilana e/ou glucomananas como os principais tipos de hemiceluloses (Brett e Waldron, 1996).

Porém, mais importante ainda é o fato de que nas paredes secundárias a água é amplamente substituída por polímeros de lignina, tornando-as quase impenetráveis a solutos e enzimas. O processo de diferenciação celular chega ao fim com uma intensa lignificação da parede celular secundária, onde a lignina estabelece uma ligação intrínseca com a matriz de celulose e hemicelulose, deixando-a mais rígida, resistente e impermeável (Dey et ai, 1997; Fry, 2008). Todos esses processos são coordenados pela expressão de um grande número de genes relacionados sobretudo à biossíntese e reunião de quatro componentes principais: celulose, hemicelulose, pectinas e lignina (Fig. 3) (Bidlack et al., 1992).



Figura 3 - Esquema representativo geral da biossíntese e arranjo estrutural dos principais componentes da parede celular vegetal: Celulose, Hemicelulose, Pectinas e Lignina (modificado, Carpita & Gibeaut, 1993).

1.3.1 - Celulose

A celulose representa o biopolímero mais abundante presente na natureza (Plomion, Leprovost et al., 2001). Possui um papel fundamental na organização da parede celular vegetal sendo que 40% da biomassa seca da parede primária, e 50% da parede secundária, são compostas por essa biomolécula. É um polissacarídeo de cadeia longa (500 a 14.000 moléculas), sem ramificações, com elevado peso molecular, e composto por subunidades (monômeros) de glicose (Cosgrove, 2005), que se organizam em feixes formando microfibrilas. Tais feixes fornecem a principal propriedade estrutural da celulose, uma resistência extremamente alta à tração (Rubin, 2008). Além disso, as longas e rígidas cadeias de microfibrilas envolvem toda a célula por meio da sobreposição de múltiplas camadas, conferindo resistência a diferentes pressões osmóticas (Somerville, 2006).

A estrutura da celulose se forma pela união de moléculas de β -glicose por meio de ligações β -1,4-glicosídicas. A celulose é sintetizada por complexos enzimáticos de membrana, denominados celulose sintetases (CESA), diretamente sobre a superfície da membrana plasmática (Fig. 3), e o estabelecimento de múltiplas interações de hidrogênio entre esses monômeros, aliadas às forças de Van der Waals, torna a estrutura da celulose impermeável e, portanto, insolúvel em água (Cosgrove, 2005). Nas plantas superiores, o complexo CESA foi identificado pela primeira vez a partir do estudo de genes envolvidos no desenvolvimento das fibras do algodão (*Gossypium hirsutum*).

Posteriormente, foram caracterizadas em *Arabidopsis* pelo menos três isoformas CESA necessárias para a síntese da parede celular primária (AtCESA1, 3 e 6) e secundária (AtCESA4, 7 e 8) (Arioli et al., 1998; Williamson et al., 1998). Em outros grupos vegetais, como milho (Appenzeller et al., 2004), cevada (Burton et al., 2005) e arroz (Yin et al., 2009), a família gênica CESA foi caracterizada como uma classe ainda maior de genes (CESA1 até CESA12), que atuam de modo coordenado para a biossíntese da celulose nas paredes celulares (Tanaka et al., 2003; Mcnamara et al., 2015).

1.3.2 - Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo componente mais abundante na biomassa das plantas. São polissacarídeos amorfos com elevada capacidade higroscópica presentes nas paredes celulares e que atuam como uma matriz onde estão imersas as cadeias de celulose, conferindo elasticidade e resistência estrutural à célula vegetal (Rubin, 2008). Além disso, estão diretamente relacionadas à mecanismos de defesa, reserva de carbono, sustentação e transporte de nutrientes e água nas plantas (Hoch, 2007; Pauly et al., 2013).

As hemiceluloses são constituídas por uma cadeia central à qual se somam cadeias laterais curtas formadas por resíduos de hexoses, pentoses e ácido urônicos. A presenças dessas cadeias laterais é o que garante a solubilidade das hemicelulose (Buckeridge et al., 2000). Elas são sintetizadas no complexo de Golgi, sendo posteriormente transportadas para a parede das células com o auxílio de vesículas (Fig. 3) (Tailor-Teeples et al., 2015).

Dentre as hemiceluloses, a mais abundante nas dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas é a xiloglucana (Hayashi et al., 2010a, 2011b). Este polissacarídeo está presente em todos os vegetais terrestres e é composto por uma cadeia principal de glicose (ligação β -1,4-glicosídica) com diferentes ramificações de xilose. Estas ramificações podem conter ainda associações com outros açúcares tais como galactoses e fucoses (Somerville et al., 2004). Em gramíneas, a xiloglucana não representa a hemicelulose mais abundante da parede celular, sendo a arabinoxilana e a β -glucana os polissacarídeos mais presentes (Gibeaut & Capita, 1993; Hsieh et al., 2010).

A arabinoxilana é um polissacarídeo formado por uma cadeia principal de xilose com substituições de arabinose. Alguns tipos de ramificações podem estar presentes, tais como radicais metila, ácido ferúlico e ácido paracumárico (Rose, 2009). Já a β -glucana, consiste em polissacarídeos de glicose ligados entre sim por ligações β -1,4, intercalados à ligações glicosídicas do tipo β -1,3. São polissacarídeos de ligação mista mas sem nenhuma ramificação.

Na última década, um grande números de genes similares ao grupo dos CESA têm sido identificados e agrupados até o momento em seis famílias (CSLA, B, C, D, E e G), sendo chamados de genes CSL (do inglês, *cellulose synthase like genes*) (Pauly et al., 2013; McFarlane et al., 2014). Apesar de alguns destes genes apresentarem sequências gênicas, funções e regiões de domínio protéico

similares aos CESA, resultados recentes tem evidenciado sua relação também com síntese de polissacarídeos não celulósicos como as hemiceluloses (Wang et al., 2012). Em Arabidopsis, foi demonstrado que genes da família CSLA e CSLC codificam as enzimas manose sintetase e xilose sintetase, respectivamente (Liempam et al., 2005). Em arroz, genes da família CSLE foram relacionados à síntese de xiloglucanas (Burton et al., 2006) enquanto que em trigo, membros da família CSLC foram relatados à síntese de xilanas (Dwivany et al., 2009). Entretanto, apesar desses estudos, pouco se sabe sobre a função bioquímica das muitas proteínas referentes a esta nova classe de genes (Scheller e Ulvskov, 2010; McFarlane et al., 2014).

1.3.3 - Pectina

As pectinas são o grupo de polissacarídeos estruturalmente mais complexos presentes na natureza. Altamente heterogêneos, são tradicionalmente caracterizados pela facilidade de extração por ácidos ou agentes quelantes, e por apresentar grandes quantidades de resíduos do ácido galacturonico, sobretudo homogalacturonano, ramnogalacturonano e silogalacturonano, além de arabinanas e galactanas (Liepman et al., 2010; Xiao et al., 2013). São um dos principais componentes da parede celular primária nas dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas (\approx 40%), e representam apenas 8-10% da parede primária nas gramíneas (Ridley et al., 2001; Scheller et al., 2007; Xiao et al., 2013).

É também o componente quase que exclusivo da lamela média (Jarvis et al., 2003) das células (\approx 65%), a qual é responsável pela adesão celular. Nela, diferentes tipos de monossacarídeos podem se organizar em uma série de estruturas polissacarídicas para formar uma matriz gelatinosa de pectinas na parede celular vegetal (Wiliats et al., 2001). As pectinas são sintetizadas no complexo de Golgi e transportadas diretamente para a membrana com o auxílio de vesículas, ou associadas à glicosiltransferases (Mohnen, 2008; Xiao et al., 2013).

A matriz de pectinas controla a porosidade da parede celular e, portanto, o movimento de macromoléculas (incluindo enzimas) e íons (Mohen, 2008; Xiao et al., 2013). A manutenção do pH, estado iônico, e nível de hidratação da matriz

trazem uma importante contribuição para as propriedades mecânicas da parede celular. Além disso, a matriz de pectinas proporciona um ambiente favorável para a deposição, deslizamento e extensão das redes de celulose-hemicelulose (Cosgrove et al., 2005).

1.3.4 - Lignina

A lignina é um dos biopolímeros de maior abundância da Terra, representando pelo menos 30% de todo o carbono presente na biomassa vegetal (Ralph et al., 2004). Sua origem remonta a 400 milhões de anos, como uma das principais características que permitiu a colonização do ambiente terrestre por plantas até então aquáticas ou subaquáticas. São moléculas complexas e heterogêneas que atuam como material incrustante em torno das microfibrilas de celulose, fornecendo rigidez e suporte mecânico à parede celular, protegendo de ataque de patógenos ou insetos, e evitando a desidratação (Rogers & Campbel ., 2004; Rubim, 2008, Yoon et al., 2015). A lignina está envolvida em diversos processos durante o crescimento dos vegetais. A deposição adequada de lignina nos diferentes tipos de células especializadas é essencial para o desenvolvimento apropriado das plantas (Li et al., 2009; Moura et al., 2010; Yang et al., 2013).

O termo lignina deriva do latim lignum = madeira (Neutelings, 2011). As ligninas são heteropolímeros fenólicos hidrofóbicos, de elevado peso molecular, formados a partir de subunidades monoméricas. São derivados da combinação de três alcoóis hidroxicinamoil (monolignóis) específicos: p-cumaril, coniferil e sinapil (Liepman et al., 2010). Esses monolignóis produzem, respectivamente, as unidades H (p-hidroxifenil), G (guaiacil) e S (siringil) durante o processo de lignificação, que ocorre mediado por enzimas oxidases presentes na parede celular. Essas enzimas (lacases e peroxidases) convertem os monolignóis em radicais livres que se polimerizam para formar as moléculas de lignina (Pomar et al., 2002; Karlsson et al., 2005; Yoon et al., 2015).

A lignina é sintetizada a partir da via de fenilpropanóides, começando com a desaminação do aminoácido fenilalanina para formar o ácido cinâmico, seguido por uma série de hidroxilações circulares, O-metilações e modificações. As enzimas envolvidas na biossíntese dos monolignóis são fenilalanina amônia liase (PAL), 4-hidroxilase ácido cinâmico (C4H), 4-(hidroxi) cinamoil CoA ligase (4CL),

hidroxicinamoil CoA:chiquimato 3'hidroxilase (C3'H), cafeoil CoA Ometiltranferase (CcoAOMT), (hidroxi)cinamoil CoA redutase (CCR), 5-hidroxilase ácido ferúlico (F5H), ácido caféico/acido 5-hidroxiferulico O-metiltransferase (COMT) e álcool (hidroxi)cinamil dehidrogenase (CAD) (Fig. 4).

A quantidade e composição das ligninas variam entre táxons, espécies e tipos celulares, e são influenciadas pelos estágios de desenvolvimento e também por fatores ambientais. Embora haja exceções, as ligninas das angiospermas são constituídas majoritariamente por subunidades G e S, com pequenas quantidades da subunidade H (*hardwood*). Nas gimnospermas (*softwood*) a lignina é composta principalmente por subunidades G e S em níveis comparáveis às dicotiledôneas, porém com uma maior quantidade da subunidade H (Kishimoto et al., 2010).

Os genes da biossíntese de lignina são expressos em diferentes tecidos vegetais, sobretudo em células esclerenquimais que circundam os elementos traqueais e as fibras vegetais (Barros et al. 2015). Muitos desses genes já foram identificados e seus principais papéis no desenvolvimento das plantas têm sido intensivamente investigados (Xu et al., 2009; Zhong et al., 2014; Gynheung et al., 2015).

Uma representação simplificada da via de síntese de lignina e as enzimas envolvidas são mostradas a seguir na Figura 4.



Figura 4 - Representação geral simplificada da biossíntese dos monômeros constituintes da lignina (H, S e G) a partir da via dos fenilpropanóides (modificado, Yoon et al., 2015).

1.4 - Regulação Transcricional da Biossíntese da Parede Celular

A regulação da transcrição gênica é um dos processos mais importantes que controlam a biossíntese da parede celular vegetal. Complexas redes de expressão gênicas são coordenadas com o auxílio de proteínas que interagem e se ligam a regiões específicas do DNA, promovendo a ativação ou repressão da transcrição de genes específicos. Tais proteínas, conhecidas como Fatores de Transcrição (FTs), são consideradas atualmente o nível mais alto de controle na regulação de diversos processos biológicos (Singh et al., 2002; Rushton et al., 2008; Nakashima et al., 2012).

Nos vegetais, muitos FTs apresentam uma complexa hierarquia regulatória e estão intimamente relacionados com a expressão dos genes da parede celular, incluindo genes da biossíntese de celulose, hemicelulose e lignina. O grupos de FTs NAC (**N**AM - NO APICAL MERISTEME, **A**TAF, e **C**UC - CUP/SHAPED COTYLEDON) e MYB, por sua vez, apresentam-se como os reguladores principais envolvidos na modulação da expressão destes genes (Zhong & Ye, 2007; Nakashima et al., 2012; Nuruzzaman et al., 2013).

O primeiro nível hierárquico na modulação de toda a rede de expressão gênica que regula a síntese da parede celular vegetal é representado pela atuação de membros da família NAC (Fig. 5). Dentre eles, três domínios de FTs são atualmente definidos como os reguladores mestres na formação da parede celular, por coordenar a síntese de todos os três componentes estruturais principais - celulose, hemicelulose e lignina - durante o desenvolvimento da planta (Wang & Dixon, 2012; Zhong & Ye, 2015). São eles: NST1 e NST2 (**N**AC **S**ECONDARY WALL **T**HICKENING PROMOTING FACTORS) e NST3/SND1 (**S**ECONDARY WALL-ASSOCIATED **N**AC **D**OMAIN PROTEIN).

Diversos estudos relacionados a FTs da família NAC constataram a existência de uma atuação conjunta, e muitas vezes tecido-específica, entre membros NST/SND durante a síntese da parede celular em plantas transgênicas de Arabidopsis. Foi demonstrado que os FTs NST1 e NST2 atuam na deposição de parede celular durante a deiscência da antera (Mitsuda et al., 2005), enquanto os FTs NST1 e SND1 atuam na deposição de lignina em fibras e feixes vasculares (Mitsuda et al., 2007; Zhong, & Ye, 2007). Outros trabalhos mostraram também que a deposição da parede celular secundária de plantas transgênicas silenciadas para NST1 e NST3 foi fortemente comprometida, enquanto a superexpressão

constitutiva de NST1 ou SND1 levou a um espessamento da parede em diversos tecidos (Zhong et al., 2007; Mitsuda et al., 2007).

Além disso, FTs membros de uma subfamília NAC conhecida como **V**ASCULAR-RELATAD **N**AC **D**OMAIN (VND), foram também caracterizados como participantes da biossíntese de componentes da parede celular - sobretudo lignina - em diversos elementos vasculares (Tran, Yamaguchi et al., 2007; Yamaguchi & Demura, 2010). Em Arabidopsis, a superexpressão dos FTs VND6 e VND7, desencadeou a formação respectiva de metaxilema e protoxilema, regulando positivamente a diferenciação e desenvolvimento do sistema vascular das plantas (Yamaguchi & Demura et al., 2010). Recentemente, os outros membros da subfamília VND (VND1-5) foram caracterizados com funções redundantes à VND6 e VND7, atuando na formação e desenvolvimento das paredes celulares de vasos condutores (Zhou et al., 2014). Em monocotiledôneas, os homólogos de NST, SND e VND são chamados **S**ECONDARY **W**ALL **N**ACS (SWN), com três representantes descritos até o momento (SWN1, SWN3 e SWN7) (Yoon & An., 2015; Chai et al., 2015).

Além do papel central que os genes da família NAC possuem na formação da parede celular vegetal, análises de microarranjo indicaram que estes FTs, além de atuarem diretamente sobre genes de síntese de celulose, hemicelulose e lignina, podem atuar também sobre outros FTs, os quais representam um segundo nível de regulação na expressão de genes da parede celular (Fig. 5) (Zhon & Ye, 2007; Zhao et al., 2010).

Este segundo nível hierárquico de regulação da expressão desses genes é representado pela ação de membros do grupo dos FTs MYB, e que são alvos diretos dos FTs NAC. Eles são também chamados de MYBs mestres, porque assim como os NACs, ativam a modulação de genes de determinadas vias da parede celular (Zhang et al., 2014). Em Arabidopsis, foi mostrado que os FTs MYB46 e MYB83 sofrem ação direta do FT NAC SND1 (Mccary & Ye, 2009). A superexpressão dos FTs MYB levou a um elevado acúmulo de todos os três principais componentes da parede celular, indicando que ambos podem atuar como reguladores mestres destas vias (Zhong et al., 2007, Zhong & Ye, 2012). Além disso, foi demonstrado que esses dois MYBs são alvos diretos dos FTs VND6 e VND7, indicando sua importância para a formação da parede celular secundária em vasos condutores (Ohashi-Ito et al., 2010; Yamaguchi et al., 2011).

34

Além de sofrer a influência direta de membros da família de FTs NAC, os FTs MYB mestres atuam ainda sobre outros FTs MYB, que irão, por sua vez, agir diretamente sobre os genes da biosíntese da parede celular, no que é considerado o terceiro nível de modulação da expressão gênica (Fig. 5). Dentre eles, foi demonstrado que os FT MYB52, MYB54 e MYB85 são reguladores positivos da síntese da parede celular secundária, visto que repressão destes três MYBs em plantas transgênicas de Arabidopsis levou á uma grande redução na espessura das mesmas (Zhong et al., 2008).

Outros FTs como MYB20, MYB43, MYB103 mostraram-se positivamente regulados apenas guando os elementos de vasos do xilema começam a se indicando diferenciar em Arabidopsis, uma potencial regulação no desenvolvimento da parede celular secundária e no processo de lignificação destes tecidos (Nakano et al., 2010). Em outro estudo, a superexpressão de MYB52 e MYB54 regulou positivamente a expressão dos genes CESA8 (Cellulose Synthase), IRX9 (Irregular Xylem 9) e 4CL (Cinamoil CoA ligase), responsáveis pela síntese de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente (Zhong et al., 2008). Além disso, dois outros TFs, MYB58 e MYB63, têm sido sugeridos como reguladores diretos da biossíntese de lignina em arabidopsis (Zhong et al, 2008; Zhou, Lee et al., 2009).

Apesar do modelo de regulação e modulação da expressão de genes da biossíntese da parede celular vegetal estar bem caracterizado em Arabidopsis (Fig. 5), estudos recentes relacionaram a um FT, o SHINE, um importante papel na formação da parede, que até então havia sido associado apenas à tolerância a seca. Mais detalhes do FT SHINE são abordados no tópico a seguir.


Figura 5 - Modelo geral simplificado das redes regulatórias transcricionais que atuam na biossíntese da parede celular. Os retângulos coloridos representam a categorização dos fatores de transcrição (FTs) em diferentes níveis hierárquicos (modificado, Yang & Wang, 2016).

1.4.1 - O Fator de Transcrição SHINE

Nos últimos anos muitos fatores de transcrição foram descobertos e ajudaram a elucidar os mecanismos relacionados à formação e desenvolvimento das paredes celulares vegetais em diversos organismos (Yang et al., 2013). Classicamente, os membros do clado SHN são descritos como reguladores das vias de formação de cera e cutina nas células epidérmicas de espécies como arabidopsis (Aharoni et al., 2004a, 2011b; Kannangara et al, 2007; Yan et a., 2011; Xu et al., 2016), tomate (Shi et al., 2012; Al-Abdallat, Hasan et al., 2014; Buxdorf, Levy et al., 2014), maça (Lashbrooke et al., 2015), cevada (Taketa et al., 2008) e arroz (Wang et al., 2012), conferindo resistência a stresses abióticos (déficit hídrico) e bióticos (ataque de patógenos). Este grupo de FTs ficou conhecido inicialmente como "SHINE/WAX INDUCER" (SHN/WIN), por induzir a produção de cera nas folhas e frutos, deixando-as com um aspecto mais brilhante. Contudo, estudos recentes de superexpressão de SHN em arroz (Oryza sativa) e switchgrass (Panicum virgatum) evidenciaram sua possível relação como regulador central da biossíntese da parede celular vegetal (Ambavaram et al., 2011; Wuddineh et al., 2015).

Existem três membros SHN em Arabidopsis: AtSHN1, AtSHN2 e AtSHN3. Estes FTs pertencem à classe ERF (ETHYLEN RESPONSIVE FACTOR), que é um subgrupo de AP2 (APETALA2) - uma grande família de proteínas reguladoras vegetais - e são caracterizados pela presença de um ou dois domínios de ligação de DNA conservados (Domínios AP2). Além disso, os FTs SHN são caracterizados por apresentar dois outros motivos exclusivos: 'mm' (domínio do meio, com cerca de 61 aminoácidos) e 'cm' (domínio C-terminal, com aproximadamente 10 aminoácidos). Os FTs da família ERF estão envolvidos na regulação da transcrição de diversos processos de crescimento e desenvolvimento vegetais, e em respostas às variações ambientais, sendo que a presença destes motivos parece exercer uma função crucial no mecanismo de ação destes genes (Wuddineh et al., 2015).

A poucos anos, Ambavaram e colaboradores (2011) demonstraram que a superexpressão heteróloga do FT SHN2 de arabidopsis (AtSHN2) em arroz, em vez de impactar na biossíntese de cera e cutina, coordenou a deposição dos componentes da parede celular vegetal. Foi detectado uma regulação direta dos fatores de transcrição MYBs e NACs e adicionalmente diversos genes da via de síntese de celulose e lignina tiveram sua expressão alterada. Além disto, a superexpressão do AtSHN2 em arroz causou um aumento médio de 30% em relação ao conteúdo de celulose, e até 45% de redução no teor de lignina presente na biomassa vegetal, sem prejuízos aparentes no desenvolvimento da planta. Outro aspecto observado é que a composição da lignina também foi alterada nas linhagens transgênicas SHN, levando a um incremento na razão S/G e maior liberação de açúcares da parede celular. Além disso, recentemente foi demonstrado em switchgrass (Panicum virgatum) que a superexpressão de um homólogo putativo de AtSHN2 desta mesma espécie, denominado dePvERF001, atua na modulação de genes de celulose hemicelulose e lignina, promovendo o aumento da biomassa e eficiencia na liberação dos açúcares da parede celular (Wuddineh et al., 2015). Juntos, estes resultados reforçam o potencial de utilização e manipulação do homólogo de AtSHN2 em cana-de-açúcar (ShSHN1), visando a obtenção de matérias primas aprimoradas para a produção de etanol 2G.

2 - Justificativa

2 - Justificativa

O estudo e o melhoramento genético de plantas com grande potencial bioenergético como a cana-de-açúcar apresenta cada vez mais importância para o desenvolvimento de cultivares que possam ser utilizadas como fonte renovável de energia para a produção de biomassa lignocelulósica advinda das paredes celulares vegetais. Nos últimos anos muitos FTs relacionados à biossíntese da parede celular têm sido isolados e caracterizados (Gray Ruiz & Grotewold, 2012; Wang & Dixon, 2012; Handakumbura & Hanzen, 2012; Yang & Wang, 2016). Porém, apesar dos mecanismos regulatórios em plantas modelos como Arabidopsis estarem bem descritos e elucidados (Zhong et al., 2011), pouco se sabe a respeito destes FTs e a síntese da parede celular nas monocotiledôneas, sobretudo em cana.

Membros da família AP2/ERF são constituídos por uma ampla classe de proteínas reguladoras que desempenham um papel importante na modulação de diversos processos de desenvolvimento e crescimento vegetais (Wuddineh et al., 2015). Dentre eles, FTs pertencentes ao clado SHINE foram recentemente caracterizados, e apesar das suas potenciais aplicações biotecnológicas no melhoramento de culturas estarem centradas na tolerância ao estresse biótico - como ataque de patógenos - e abióticos - como a escassez hídrica, poucos esforços tem sido realizados para utilizar este potencial no melhoramento genético de monocotiledôneas, visando a obtenção de biomassa lignocelulósica diferenciada para a produção de biocombustíveis como o etanol 2G (Saha, Ramachandran et al., 2013; Weng, Xu et al., 2008; Furtado, Hoang et al., 2014).

Em 2010 nosso grupo de pesquisa iniciou um projeto de identificação e validação de fatores de transcrição envolvidos com a via de biossíntese de lignina na parede celular secundária em cana-de-açúcar (FAPESP 2010/11476-8). Dentre os genes identificados e avaliados quanto ao perfil de expressão em diferentes regiões e estágios de desenvolvimento, encontra-se o possível ortólogo dos FTs OsSHN1 e AtSHN2, nomeado ShSHN1 (Santos Brito et al., 2015). Este gene foi originalmente identificado por meio de buscas em um banco de dados de RNA-seq (Locus_27034) realizado a partir do sequenciamento do transcriptoma de duas variedades de cana-de-açúcar contrastantes para a quantidade de lignina [IACSP04-065 (baixo teor de lignina) e IACSP04-627 (alto teor de lignina)] (Vicentini, Bottcher et al., 2015).

Assim, este trabalho dedica-se ao desenvolvimento de estudos funcionais do FT ShSHN1, utilizando como estratégia a obtenção de plantas geneticamente modificadas de arroz que superexpressem ShSHN1. Em uma perspectiva futura, o conhecimento adquirido poderá ser útil ao desenvolvimento de variedades comerciais de cana-de-açúcar que possam ser utilizadas na produção de etanol 2G.

3 - Objetivos

3 – Objetivos

3.1 - Objetivo Geral:

 O objetivo geral deste projeto é a caracterização funcional do FT ShSHN1 de cana-de-açúcar por meio da superexpressão heteróloga em plantas de arroz (*Oriza sativa*) e investigar sua relação com a biossíntese da parede celular vegetal.

3.2- Objetivos Específicos:

 Identificação, clonagem e caracterização da sequência de DNA codificadora do FT ShSHN1 de cana-de-açúcar.

• Obtenção de plantas de arroz geneticamente modificadas por meio da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando uma construção de superexpressão do gene ShSHN1.

• Identificação de possíveis genes alvo do FT ShSHN1 por meio de análises por qPCR das linhagens obtidas.

 Análise do efeito da superexpressão de ShSHN1 no desenvolvimento da planta e na composição da parede celular, por meio de avaliações biométricas e caracterização bioquímica.

• Determinação do conteúdo de lignina e dos polissacarídeos estruturais que compõe a parede celular (celulose, hemicelulose e pectina) das linhagens transgênicas ShSHN1 comparadas ao tipo-selvagem.

• Determinação do percentual de sacarificação nas linhagens ShSHN1 comparadas ao tipo-selvagem.

4 - Material e Métodos

4 - Material e Métodos

4.1 – Material Vegetal

Para o isolamento, clonagem e caracterização da região codificadora do gene *SHINE* (SHN) de cana-de-açúcar (ShSHN1), foram utilizadas amostras de colmo da cultivar IACSP04-065 desenvolvida pelo programa de melhoramento genético do Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana (IAC). Para os experimentos de transformação genética de arroz (*Oryza sativ*a) foi utilizada a variedade Nipponbare (cv. japonica).

4.2 – Análises de Bioinformática

Como ponto de partida para a caracterização e posterior clonagem da região codificadora do FT ShSHN1 (sequência <u>ShSHN1</u>), foram realizadas buscas *in sílico* utilizando a ferramenta *tBlastx* (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra o banco de dados SUCEST (*Sugarcane EST's / ssucest-fun.org*). Sequências SHN de Arabidopsis (Aharoni et al., 2004) e arroz (Ambavaram et al., 2011) foram utilizadas como referência (iscas) para a identificação das sequências candidatas de cana-de-açúcar (SAS – sugarcane assembly sequences). Adicionalmente, foram realizadas buscas em um banco de dados particular advindo de um experimento de RNA-seq (Vicentini et al., 2015) para dois genótipos contrastantes em relação ao teor de lignina [IACSP04-065 (conteúdo médio - 4,32%) e IACSP04-627 (conteúdo médio - 8,12%)].

Análises de alinhamento e filogenia entre as sequências de aminoácidos SHN descritas pela literatura, e também entre sequências genômicas homólogas a SHN provenientes de uma busca em bancos de dados de milho, sorgo e arroz (*www.phytozome.net*), foram conduzidas. A elaboração do dendograma foi realizada utilizando o método estatístico da máxima verossimilhança (*maximum likelihood*), com bootstrap = 300. Para tanto, o programa ClustalX (Larkin et al., 2007 - *www.clustal.org*) foi empregado no alinhamento das sequências e o programa MEGA 5.1 (Tamura, 2007 - *www.megasoftware.net*) foi utilizado na construção e visualização da árvore filogenética.

4.3 – Desenho dos Iniciadores (primers) para a Amplificação do FT ShSHN1

O conhecimento da sequência de nucleotídeos que compõe sua ORF (*open reading frame*) e o desenho de *primers* específicos são imprescindíveis para a correta amplificação e posterior clonagem da região codificadora do gene ShSHN1. Para tanto, os *primers* ShSHN1-F e ShSHN1-R (Tabela 1) foram desenhados utilizando a ferramenta Primer Quest Tool (*www.idtdna.com/primerquest/home/index*). A viabilidade e qualidade dos *primers* foram avaliadas quanto à porcentagem de C/G, temperatura de anelamento (Tm) e ausência de homo e hetero dímeros, com o auxílio do *software* Net Primer (*www.premierbiosoft.com/netprimer*).

Tabela 1 - *Primers* utilizados na amplificação da sequência <u>ShSHN1</u>. Nome, seqüência e temperatura de anelamento dos *primers* estão em evidência.

Primer	Sequência (5'-3')	Tm (50 mM Na ⁺)
ShSHN1-F	ATGCCATAACACTGAGCTAC	53 °C
ShSHN1-R	TACCCGTCGTCTGTAACATGA	55 °C

4.4 – Extração de RNA Total

O RNA total utilizado para posterior síntese de cDNA e subsequente clonagem da sequência referente ao gene ShSHN1 foi extraído de amostras de colmo do genótipo IACSP04-065, utilizando a metodologia de extração por Trizol[®] (Life Technologies) seguindo a recomendações do fabricante. Com o intuito de minimizar quaisquer efeitos de degradação do RNA por RNAses, todas as soluções e reagentes foram preparadas com água Mili-Q previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) na concentração de 1% (v/v), por 16 horas a 37 °C, seguida de autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 minutos). As vidrarias e porcelanas utilizadas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 10% e esterilizadas a seco, a 200 °C, por 10-12 horas.

Aproximadamente 250 mg de tecido do colmo foram macerados em nitrogênio liquido (N_2) com o auxílio de pistilo e cadinho. O material macerado foi transferido cuidadosamente para tubos de 2 mL *RNAse free* contendo 1 mL de Trizol[®], seguido de agitação rápida em *Vórtex*, e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente (25-30 °C). A seguir, foram adicionados 200 µL de clorofórmio por tubo, agitados vigorosamente por 30 segundos, e incubados novamente à temperatura ambiente por 3 minutos, antes da centrifugação a 12.000 g, por 15 minutos, a 4 °C. A fase sobrenadante foi delicadamente transferida para um novo tubo *RNAse free* ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol.

A amostra foi agitada por inversão, seguida de repouso por 10 minutos para a precipitação do RNA. Após nova centrifugação a 12.000 g, por 15 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado. Por fim, a amostra foi centrifugada a 12.000 g, por 20 minutos, a 4 °C, o sobrenadante descartado, e o precipitado foi seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos, antes de ser ressuspendido em 50 μ L de água DEPC.

4.4.1 – Quantificação do RNA Total

A quantificação das amostras de RNA foi realizada por espectrofotometria com o auxílio do equipamento Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). Este aparelho quantifica amostras de ácidos nucléicos segundo a fórmula abaixo:

C = Abs x Fc x Fd

onde **C** é a concentração de DNA ou RNA em ng/µL, **Abs** é a absorbância (neste caso 260nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs por ácidos nucléicos), **Fc** é o fator de conversão (que para RNA é igual a 35 ng.cm/µL) e **Fd** corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura. Deste modo, quando o equipamento mede a absorbância das amostras a 260nm, obtém-se um valor que multiplicado por 35 (constante **Fc**) indica a concentração de RNA na amostra, expressa em ng/µL.

É importante avaliar a absorbância das amostras a 280nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de proteínas, e também a 230nm, que corresponde ao pico de absorção por contaminantes orgânicos. Assim, ao calcular as razões de absorbância 260/280 e 260/230, pode-se verificar o grau de pureza das amostras. Quanto maior for a pureza (ou seja, quanto menores forem as quantidades de proteínas ou solventes orgânicos - como alcoóis e fenóis utilizados na metodologia de extração) maiores serão estas razões. Geralmente utiliza-se como valores de referência de pureza dos ácidos nucléicos (DNA ou RNA) o valor de 1,8, ou seja, considera-se que a amostra possui um elevado grau de pureza quando A260/280 \geq 1,8 e A260/230 \geq 1,8.

Além disso, a qualidade e integridade do RNA também foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Para tanto, o volume correspondente a 1 μ g de RNA total em 10 μ l de H₂O DEPC foi aplicado no gel e submetido a uma corrida de 80V por 30 minutos. A cuba de eletroforese e seus demais componentes foram previamente tratados com peróxido de hidrogênio 10% (H₂O₂) e enxaguados com H₂O DEPC para estarem livres de RNAses. Por fim, as amostras foram eluídas em TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e armazenadas a -80 °C.

4.5 - Reação de Síntese de cDNA

A reação de síntese de DNA complementar (cDNA) consiste na confecção de moléculas de DNA de fita dupla a partir de um molde de mRNAs. Com o auxílio da enzima Transcriptase Reversa a conversão de mRNAs em cDNAs é realizada quimicamente e o cDNA recém sintetizado pode então ser utilizado em reações de PCR.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit comercial *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega) a partir de 1 µg de RNA total previamente tratados com uma unidade (1U) de DNAse RQ1 (*Promega*), por 30 minutos, a 37 °C. Após este processo, foram adicionados a um microtubo de ensaio 10 µl de RNA total (1 µg) e 1 µl de Oligo dT (0,5 µg/µl). Após 5 minutos de incubação à 70 °C, a reação de transcrição reversa foi realizada nas seguintes condições: 12 µl de reação (RNA total tratado com RNAse + Oligo dT), 4 µl de tampão *Improm-II 5x Reaction Buffer*, 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de *Recombinant RNasin*[®] *Ribonuclease Inhibitor* (40 U/µl) e 1 µl da enzima *ImProm-II RT* (25 U/µl) em um volume final de 20 µl. Por fim, as amostras foram incubadas em termociclador *Thermo Cycle 2720* (Applied Biosystems), primeiramente à 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos, e depois a 70 °C por 15 minutos.

4.6 – Amplificação, Clonagem e Caracterização da Sequência ShSHN1

4.6.1 – Amplificação da Sequência ShSHN1 a partir do cDNA de Cana-de-Açúcar

Com o intuito de amplificar e posteriormente clonar a região codificadora do gene ShSHN1, reações de PCR utilizando como molde um *pool* de cDNAs provenientes de colmos da variedade IACSP04-065, e os *primers* descritos na Tabela 1, foram conduzidas em termociclador *Thermo Cycle 2720* (Applied Biosystems) nas condições descritas abaixo:

Montagem da Reação:

35,5 µl →	H ₂ O Milli Q (completar para 50 μl)
10,0 µl →	Tampão Taq Phusion (10X) (Thermo Scientific)
1,0 µl →	Oligonucleotídio ShSHN1-F (10 μM)
1,0 µl →	Oligonucleotídio ShSHN1-R (10 µM)
1,0 µl →	dNTP (10 mM)
1,0 µl →	cDNA molde (30 ng/µl)
0,5 µl →	Enzima Taq DNA Polimerase Phusion (2U/ μ I) (Thermo Scientific)

Condições de Amplificação:

Desnaturação inicial (98 °C)	- 45 segundos
Desnaturação (98 °C)	- 10 segundos
Pareamento (55 ºC)	- 30 segundos
Extensão (72 ºC)	- 45 segundos
Número de ciclos	- 30 ciclos
Extensão final (72 °C)	- 10 minutos

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, sob tensão constante de 80 volts, e visualizado sob luz UV a 254 nm.

4.6.2 – Subclonagem do Fragmento ShSHN1 para Sequênciamento

Após a corrida eletroforética, o fragmento de DNA amplificado foi excisado e purificado a partir do gel de agarose. O DNA foi recuperado com o auxílio do Kit comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Após, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) e armazenado a -20 °C.

Com o objetivo de sequenciar e verificar previamente o conteúdo do fragmento amplificado, isto é, identificar possíveis variações na sequência tais como mutações, deleções ou inserções, uma etapa adicional ao processo de subclonagem foi realizada, sendo o fragmento inserido no vetor comercial *pGEM T-Easy* (Promega) e clonado em *E. coli* (cepa DH10B - Anexo 8.2). Posteriormente, os clones obtidos foram enviados para o sequenciamento no Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - SP (*www.genoma.ib.usp.br/pt-br/servicos/sequênciamento-de-dna*).

4.6.3 – Análises das Sequências de DNA dos Clones Obtidos

As sequências de nucleotídeos obtidas e os cromatogramas oriundos do sequenciamento foram analisados com o auxílio do *software* BioEdit (*www.mbio.ncsu.edu/bioedit*) (Hall, 1999). Arquivos tipo "FASTA" foram gerados individualmente para cada clone e as sequências consenso (*contigs*) com melhor qualidade foram selecionadas. As sequências de DNA consenso foram obtidas sempre pela sobreposição de no mínimo duas sequências *foward* e uma sequência *reverse* para cada clone obtido.

4.7 – Construção do Vetor de Superexpressão em Arroz

Para a clonagem e construção do vetor de superexpressão contendo a sequência <u>ShSHN1</u> foi utilizado o Sistema Gateway de Recombinação (Life Technologies).

4.7.1 - Recombinação em Vetor de Entrada pDONR 221

Como vetor de entrada para a clonagem e inserção da sequência <u>ShSHN1</u> pelo sistema Gateway, foi utilizado o vetor comercial pDONR 221. Inicialmente, foram necessárias a criação de sítios específicos de reconhecimento attB1 e attB2 nas extremidades 5' e 3' do fragmento <u>ShSHN1</u>, previamente amplificado e clonado em vetor pGEM. Estes sítios foram criados a partir de duas etapas sucessivas de PCR. Na primeira etapa, uma reação de PCR com os *primers* attB1 e attB2 foi realizada. Os *primers* attB1 e attB2 são formados por sequências híbridas que possuem uma região de aproximadamente 21pb que anelam respectivamente nas extremidades 5' e 3' do gene alvo, e outra região, de 12pb (attB1) e 10pb (attB2) respectivamente, que são as regiões iniciais dos sítios recombinação attB1 e attB2.

Na segunda etapa, uma nova reação de PCR foi conduzida para concluir a inserção dos sítios attBs às extremidades da sequência <u>ShSHN1</u> utilizando-se os *primers* BP1 e BP2 (Tabela 2). Ao final de cada etapa os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, e purificados utilizando o Kit comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega). As reações de PCR foram conduzidas seguindo as condições descritas a seguir:

Montagem da Reação 1 - Construção dos Sítios attb:

35,5 µl →	H ₂ O Milli Q (completar para 50 μl)
10,0 µl →	Tampão Taq Phusion (10X) (Thermo Scientific)
1,0 µl →	Oligonucleotídio attB1 (10 µM)
1,0 µl →	Oligonucleotídio attb2 (10 µM)
1,0 µl →	dNTP (10 mM)
1,0 µl →	DNA Plasmidial (15 ng/µl)
0,5 µl →	Enzima Taq DNA Polimerase Phusion (2U/ μ I) (Thermo Scientific)

Condições de Amplificação:

Desnaturação inicial (98 °C)	- 45 segundos
Desnaturação (98 °C)	- 10 segundos
Pareamento (55 ºC)	- 30 segundos
Extensão (72 ºC)	- 45 segundos
Número de ciclos	- 30 ciclos
Extensão final (72 °C)	- 10 minutos

Montagem da Reação 2 - Construção do Sítios BP:

35,5 µl →	H_2O Milli Q (completar para 50 µl)
10,0 µl →	Tampão Taq Phusion (10X) (Thermo Scientific)
1,0 µl →	Oligonucleotídio BP1 (10 μM)
1,0 µl →	Oligonucleotídio BP2 (10 µM)
1,0 µl →	dNTP (10 mM)
1,0 µl →	DNA Plasmidial (15 ng/µl)
0,5 µl →	Enzima Taq DNA Polimerase Phusion (2U/µI) (Thermo Scientific)

Condições de Amplificação:

Desnaturação inicial (98 °C)	- 45 segundos
Desnaturação (98 °C)	- 10 segundos
Pareamento (55 ºC)	- 30 segundos
Extensão (72 ºC)	- 45 segundos
Número de ciclos	- 30 ciclos
Extensão final (72 °C)	- 10 minutos

Tabela 2: Primers utilizados no sistema Gateway. Nome, sequência e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados na construção dos sítios attB para recombinação no vetor de entrada pDONR 221.

Primer	Sequência (5'-3')	Tm (50 mM Na ⁺)
attB1	GCAGGCTTCACC + (20 pb gene)	64 °C
attB2	AAGCTGGGTC + (20 pb gene)	63 °C
BP1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC	60 °C
BP2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	62 °C

Após esta etapa, foi realizada uma reação de recombinação entre o fragmento <u>ShSHN1</u> contendo os sítios attBs e o vetor de entrada pDONR 221. Para tanto, a enzima *BP Clonase II* (Invitrogen) foi utilizada conforme instruções do fabricante. Esta enzima reconhece os sítios attBs presentes nas extremidades do DNA alvo que contem a sequência <u>ShSHN1</u> - e promove sua recombinação com o vetor pDONR 221 em regiões especificas denominados sítios attPs (Fig. 6). Em seguida, o vetor de entrada recombinado (pENTR:<u>ShSHN1</u>) foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* (cepa DH10B) por eletroporação (Anexo 8.3).

Após a obtenção dos clones transformados em meio seletivo, uma reação de PCR das colônias foi realizada para confirmar a presença da sequência <u>ShSHN1</u> utilizando-se os *primers* ShSHN1-F e ShSNH-R (Tabela 1). Os produtos advindos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, a 80 V, por 45 minutos, e as bandas obtidas foram visualizadas por meio de coloração com brometo etídio (10 μ g/mL), sobre luz ultravioleta, a 254 nm (Sambrook & Fritsch, 1989). Após a confirmação dos transformantes, os clones foram inoculados em meio LB seletivo e incubados por 16 horas para a posterior extração plasmidial.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit comercial *Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega), quantificado e enviado para sequênciamento. A análise de qualidade das sequências e a formação dos *contigs* foram realizadas novamente com o auxílio do *software* BioEdit.



Figura 6: Representação esquemática da reação de recombinação entre a sequência <u>ShSHN1</u>, flanqueada pelos sítios attB, e o vetor pDONR 221, contendo os sítios attP. O produto final desta reação é o vetor de entrada pENTR:<u>ShSHN1</u>.

4.7.2 – Reações de Recombinação Múltipla

Para a realização das reações de recombinação múltipla, foram utilizados vetores específicos tanto de entrada quanto de destino. Estas reações tiveram como objetivo recombinar ao mesmo tempo mais de um fragmento de DNA, em regiões e orientações específicas, gerando como produto final um vetor de destino exclusivo para a superexpressão em monocotiledôneas. Para tanto, foi realizada uma busca inicial no banco de vetores internacional do VIB (*www.gateway.psb.ugent.be/search*).

O vetor de destino precisou ser "engenheirado" por meio de reações múltiplas de recombinação, e a escolha dos vetores que serviram de base para a elaboração do vetor final, foi guiada levando-se em consideração os promotores, terminadores e marcadores de seleção apropriados. Sítios específicos para estas recombinações no sistema Gateway, ideais para a concepção do vetor de destino final, também foram levados em consideração.

Atendendo a essas características, os vetores pHb7m24GW (arcabouço) e pEN-L4-UBIL (contendo o promotor Ubi-1 da ubiquitina de milho) foram adquiridos e utilizados para a construção do vetor de superexpressão pOE<u>ShSHN1</u>. A enzima *LR Clonase II Plus* (Life Technologies) foi utilizada nesta etapa por ter a capacidade de reconhecer diferentes sítios de recombinação e promover a interação entre eles. A reação de recombinação foi realizada conforme instruções do fabricante e o esquema geral simplificado pode ser observado na Figura 7.



Figura 7 - Esquema representativo da reação de recombinação múltipla Gateway. Regiões específicas dos vetores pENTR:<u>ShSHN1</u>, pHb7m24GW e pEN-L4-UBIL, são recombinadas originando o vetor final de superexpressão pOE<u>ShSHN1</u>. **T-35S e T-nos:** terminadores. **P-35S e Ubi-1:** promotores que regulam, respectivamente, a expressão dos genes marcadores de seleção para higromicina (*hpt*) e para a sequência de interesse (<u>ShSHN1</u>). **RB e LB:** borda direta e borda esquerda do T-DNA.

Após a reação de recombinação múltipla, com subsequente transformação em *E. coli*, o cassete final de superexpressão (Fig. 8) foi sequenciado a fim de conferir a correta orientação das sequências clonadas. Para tanto, os *primers* P-Ubi1-F e T-35S-R - que anelam respectivamente na região 3`do promotor da ubiquitina e 5´do terminador 35S - foram utilizados (Tabela 3). Por fim, células

de *Agrobacterium tumefaciens* (Cepa EHA-105 - Anexo 8.4) foram transformadas por eletroporação com o vetor final - nomeado pOE<u>ShSHN1</u> - e armazenadas em glicerol 30%, a -80°C.



Figura 8 - Representação ilustrativa dos cassetes de expressão da região codificadora <u>ShSHN1</u> e higromicina (*hpt*) presentes no T-DNA do vetor pOE<u>ShSHN1</u>. **Retângulos Verticais**: bordas esquerda (LB) e direita (RB) do T-DNA. **Setas Cinzas**: Sequências referentes aos promotores CaMV 35S e Ubi-1. **Setas Brancas**: Sequências codificadoras do gene *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*) e SHN de cana-de-açúcar (<u>ShSHN1</u>). **Quadrados Pretos**: Sequências dos terminadores Nopalina Sintetase (T-nos) e CaMV 35S (T-35S). Nomes, locais de pareamento e orientação dos *primers* utilizados para a detecção do transgene por PCR estão em evidencia (P-Ubi1-F e T-35S-R).

Tabela 3: *Primers* utilizados para checar a orientação das sequências de DNA recombinadas no vetor de destino pOE<u>ShSHN1</u>. Nome, sequência e temperatura de pareamento dos *primers* utilizados no sequenciamento da região do T-DNA que contem a sequência <u>ShSHN1</u>.

Primer	Sequência (5'-3')	Tm (50 mM Na ⁺)
P-Ubi1-F	GTACAAGACAGCTGGGTC	51 °C
T-35S-R	CAGATGATGAAGCGACCT	52 °C

4.8 - Localização Subcelular do FT ShSHN1

Para avaliar a localização subcelular do FT ShSHN1, foi realizado um experimento de transformação transiente via infiltração por *Agrobacterium tumefaciens* em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Sparkes et al., 2006). Para isso, a sequência nucleotídica <u>ShSHN1</u> foi fusionada à sequência codificadora da proteína fluorescente GFP (do inglês, *green fluorescente protein*) em um vetor final de expressão. A sequência codificadora completa <u>ShSHN1</u>, com exceção do códon de parada da tradução (TGA), foi recombinada com o vetor de entrada do Sistema Gateway (pDONR 221) com o auxílio da enzima *BP Clonase TM II* (Life Technologies). A seguir, para gerar a proteína quimérica referente ao gene ShSHN1 fusionado à proteína GFP, o vetor pK7FWG2 foi recombinado com o vetor de entrada pENTR:<u>ShSHN1</u>-TGA utilizando o mix de enzimas *LR Clonase TM II Mix* (Life Technologies).

Após confirmação por digestão e sequenciamento, o vetor final p<u>ShSHN1</u>-GFP foi utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens* (Cepa pGV2260)(Anexo 8.5). Folhas de *Nicotiana benthamiana* foram infiltradas com a solução de *Agrobacterium* e as plantas foram incubadas por 1-2 dias, a 28 °C. Após esse período, as folhas foram seccionadas e submetidas à marcação dos núcleos celulares com a utilização do reagente DAPI (4'-6-diamidino-2fenilindol). Em seguida, a localização da florescência do GFP foi observada em microscópio Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) (Sparkes, Tolley et al., 2010).

Em paralelo, análises computacionais utilizando a sequência de aminoácidos referentes ao gene ShSHN1 foram realizadas com o auxílio da ferramenta MultiLoc (*http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/index_html*) para a predição computacional de sua localização subcelular.

4.9 – Transformação Genética de Arroz Mediada por Agrobacterium tumefaciens

Os experimentos de transformação genética de arroz (*Oryza sativa*), foram conduzidos com a variedade Nipponbare (cv. japonica), seguindo a metodologia proposta por Toki et al. (2006), com algumas modificações descritas a seguir:

Sementes descascadas de arroz foram esterilizadas previamente com etanol 70% por 2 min e hipoclorito de sódio 2,5% por 20 min, lavadas por cinco vezes em água destilada estéril, e deixadas secar em fluxo laminar por 40 min. Após, as sementes foram inoculadas em meio de indução de calos embriogênicos (N6D), solidificado com *Gelrite* 0,4%, e cultivadas durante 12-14 dias, a 33 °C, sob luz constante. Para a transformação genética vegetal, os calos embriogênicos foram inoculados em uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* em meio AAM ($OD_{600} < 0,1$) durante 1,5 min e, posteriormente, foram deixados secar sobre papel filtro, em fluxo laminar, por 30-45 min. A seguir, os calos foram transferidos para papel filtro estéril (9 cm diâmetro) umedecido em 0,5 mL de meio AAM, colocado sobre o meio 2N6-AS solidificado com *Gelrite* 0,4%. Os calos foram co-cultivados no escuro a 22 °C por 3 dias.

Após o período de co-cultura, os calos foram lavados 5 vezes em água estéril, seguida de uma lavagem em água contendo 40 mg/L de Meropenem para a remoção/eliminação das agrobactérias. Após secos, foram colocados em meio de cultura N6D contendo 30 mg/L de higromicina e 20 mg/L de Meropenen, sob luz continua, a 32 °C, por 10-14 dias. A higromicina é o antibiótico que atua como agente seletivo e que seleciona as plântulas recém transformadas, e o Meropenem é o antibiótico utilizado para conter o crescimento da agrobactéria junto aos calos embriogênicos, após o processo de transformação. A seguir, os calos foram transferidos para o meio de regeneração RE-III, incubados sob fotoperíodo de 16 h/luz e 8 h/escuro a 28 °C, sendo subcultivados a cada 2 semanas, por até 5 subcultivos, para a regeneração completa e o enraizamento das plantas transformadas. Todos os meios de cultura e soluções utilizados nesta etapa encontram-se disponíveis no Anexo 8.1.

4.10 – Confirmação dos Eventos Transgênicos de Arroz

A confirmação inicial das plantas transgênicas de arroz foi realizada por meio de reações de PCR para cada evento regenerado. Para tanto, o DNA genômico foi extraído a partir de folhas das plantas de arroz completamente regeneradas *in vitro*, seguindo o protocolo desenvolvido por Al Janabi et al. (1999), conforme descrito a seguir.

Aproximadamente 150 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido sendo posteriormente transferidos para 550 µL de tampão de homogeinização [2,2 M NaCl; 2% CTAB; 200 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM EDTA; 0,06% Sulfito de Sódio]. Em seguida, 450 µL de tampão de lise foram adicionados a cada amostra [20% CTAB; 10% PVP; 5% N-lauryl-sarcosine] e incubados por 1 h a 65 °C. Após resfriamento, 1 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado a cada amostra e em seguida foram agitadas por inversão durante 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10.000 g, por 5 min, a 4 °C. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo adicionando-se 1 volume de isopropanol absoluto e 200 µL de NaCl 5 M.

A suspensão foi então incubada por 1 h a -20 °C, e em seguida, centrifugada por 5 min à 10.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%. Após nova centrifugação por 5 min à 10.000 g, o etanol foi descartado e o precipitado (*pellet*) seco a 37 °C. Por fim, o DNA foi ressuspenso em 50 µL TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA] e tratado com 1 µg/mL de RNase por 1 hora. A integridade do DNA extraído foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (10 µg/mL), e visualizado sob luz UV a 254 nm. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se os *primers* P-Ubi1-F e T-35S-R (Tabela 3) descritos anteriormente e que amplificam a sequência <u>ShSHN1</u> presente no T-DNA das plantas transformadas (Fig. 8). As reações foram preparadas e conduzidas no termociclador *Thermo Cycle 2720* (Applied Biosystems) conforme descrito a seguir:

Montagem da Reação:

17,4 µl →	H_2O Milli Q (completar para 25 µl)
5,0 µl →	Tampão Green (5X) (Promega)
0,5 µl →	Oligonucleotídio P-Ubi1-F (10 µM)
0,5 µl →	Oligonucleotídio T-35S-R (10 µM)
0,5 µl →	dNTP (10 mM)
1,0 µl →	DNA genômico (50 ng/µl)
0,1 µl →	Enzima GoTaq DNA Polimerase (10 U/µl) (Promega)

Condições de Amplificação:

Desnaturação inicial (95 °C)	- 2 minutos
Desnaturação (95 °C)	- 30 segundos
Pareamento (55 °C)	- 20 segundos
Extensão (72 ºC)	- 45 segundos
Número de ciclos	- 35 ciclos
Extensão final (72 °C)	- 10 minutos

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, sob tensão constante de 80 volts, e visualizado sob luz UV a 254 nm.

4.10.1 – Níveis de Expressão de ShSHN1 nas Plantas Transformadas (T₀)

Os níveis de expressão relativa dos eventos transgênicos obtidos foram avaliados por qPCR (PCR quantitativa). Os primers SHNqPCR-F e SHNqPCR-R (Tabela 4) foram desenhados e utilizados para quantificar a expressão relativa do transgene ShSHN1 presente no T-DNA das plantas transformadas. A extração de RNA das plantas de arroz transgênicas e tipo selvagem (WT), a síntese de cDNA, e as condições das reações de qPCR seguiram os passos descritos nos itens 3.4-5. Como normalizador das reações, o gene eEF1a (*elongation factor 1 alpha*) foi utilizado (Jain et al., 2006; Andrade, 2016).

Para a obtenção dos valores de expressão relativa, foi utilizado o método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), sendo que a planta com o menor nível de expressão foi utilizada como referência (calibrador), uma vez que as plantas selvagens (WT) não contêm a sequência exógena <u>ShSHN1</u>.

Tabela 4: *Primers* utilizados na quantificação da expressão de ShSHN1 por qPCR nos eventos transgênicos obtidos. Nome, seqüência e temperatura de pareamento dos *primers* estão em evidência.

Primer	Sequência (5'-3')	Tm (50 mM Na ⁺)
SHNqPCR-F	CCACTCCAGGAAAATGGTACA	56 °C
SHNqPCR-R	CCAGCCAGACCCTCCTCTTA	58 °C

Após a confirmação da inserção do transgene por PCR, e dos níveis de expressão gênica por qPCR, as plântulas advindas de eventos de transformação independentes - ou seja, que regeneraram a partir de um único calo embriogênico transformado - foram aclimatadas em casa de vegetação e posteriormente transferidas para vasos de 5 litros contendo terra, substrato vegetal e nutrientes apropriados, seguindo a formulação descrita abaixo:

- Terra Vermelha →	2,5 Litros
- Substrato Vegetal \rightarrow	2,5 Litros
- Sulfato de Amônio [(NH₄)2SO₄] →	3 g
- Cloreto de Potássio (KCl) →	1 g
- MAP (NH ₄ H ₂ PO ₄) \rightarrow	0,75 g
- Sulfato de Zinco (ZnSO ₄) \rightarrow	125 mg

4.11 – Estimativa do Número de Cópias do Transgene

A estimativa do número de cópias do transgene inserido no genoma das plantas de arroz transformadas, foi realizada por qPCR-TaqMan[®] O gene *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*), presente no T-DNA das plantas transgênicas, foi utilizado como alvo para a determinação indireta do número de cópias do transgene ShSHN1 inserido em cada evento. O gene SPS (*sucrose phosphate synthase*), que existe em cópia única no genoma de *Oryza sativa* (Jiang et al., 2009), foi utilizado como referência para os cálculos.

Concentrações distintas de cada par de *primers* (0,2 μ M; 0,4 μ M; 0,8 μ M) foram avaliadas previamente para a obtenção da melhor eficiência de reação (Peixoto, 2016). Para tanto, uma diluição seriada de 5 pontos (1/10, 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160) a partir de um pool de cDNA de folhas e perfilhos de arroz, foram utilizadas no estabelecimento de uma curva padrão. Posteriormente, um *pool* de DNAs genômicos dos eventos escolhidos para as análises foi utilizado no estabelecimento de uma nova curva padrão a partir de uma diluição seriada (1:2) com seis pontos. As curvas padrão foram utilizadas na determinação da eficiência de reação e também para o cálculo da estimativa do número de cópias do transgene. Os *primers* utilizados nesta etapa estão descritos na Tabela 5.

As reações de qPCR-TaqMan foram realizadas em quintuplicatas técnicas e em multiplex para os genes *hpt* e SPS e conduzidas em termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems), nas condições descritas a seguir:

Montagem da Reação:

2,6 µl →	H_2O Milli Q (completar para 20 $\mu l)$
10,0 µl →	TaqMan Fast Advanced Master Mix
0,6 µl →	Oligonucleotídio SPS-F (20 µM)
0,6 µl →	Oligonucleotídio SPS-R (20 µM)
0,6 µl →	Oligonucleotídio Hpt-F (20 µM)
0,6 µl →	Oligonucleotídio Hpt-R (20 µM)
1,5 µl →	Sonda SPS (2,5 µM)
1,5 µl →	Sonda Hpt (2,5 µM)
2,0 µl →	DNA genômico (10 ng/µl)

Condições de Amplificação:

Incubação Inicial (50 °C)	- 2 minutos
Ativação da Polimerase (95 °C)	- 20 segundos
Denaturação (95 ºC)	- 1 segundo
Anelamento e Extensão (72 ºC)	- 20 segundos
Número de ciclos	- 40 ciclos

Tabela 5: *Primers* e sondas utilizados na detecção do número de cópias do transgene ShSHN1 por qPCR-TaqMan. Nome, seqüência e temperatura de pareamento dos *primers* e sondas estão em evidência.

Primer	Sequência (5'-3')	Tm (50 mM Na ⁺)	
SPS TaqMan-F	TTGCGCCTGAACGGATAT	59 °C	
SPS TaqMan-R	CGGTTGATCTTTTCGGGATG	60 °C	
Hpt TaqMan-F	CGCAGCGATAGCATCCATAG	60 °C	
Hpt TaqMan-R	AGACCTGCCTGAAACCGAACT	60 °C	
Sonda	Sequência (5'-3')		
Hpt	VIC-CCGGCTGAAGAAC-MGBNFQ		
SPS	6FAM-GACGCACGGACGGCTCGG-AMGBNFQ		

Os cálculos para a estimativa do número de cópias do transgene foram realizados a partir dos valores de CT (*cycle threshold*) obtidos tanto para o transgene *hpt*, quanto para o gene normalizador SPS nas amostras transgênicas. Estes valores foram utilizados para a obtenção da curva padrão, e no cálculo dos valores iniciais de SQ (do inglês, *starting quantity*) e dos coeficientes R1 e *Rline*, seguindo a metodologia descrita por Mason et al. (2002). Por fim, o número estimado de cópias do transgene para cada linhagem transformada foi determinada pela razão entre *Rline* e R1 (*Rline* / R1).

4.12 – Obtenção da Geração T₁ e Análise de Segregação

Os 15 eventos transgênicos primários (T_0) confirmados por PCR e qPCR foram cultivados por aproximadamente 120 dias em casa de vegetação para o completo desenvolvimento das plantas e produção de sementes. Uma parte dessas sementes - pertencentes à geração T_1 - foi avaliada quanto ao padrão de segregação do gene que confere resistência à higromicina (*hpt*), presente no T-DNA das plantas transformadas. Para isso, sementes de arroz de cada evento foram descascadas e esterilizadas previamente com etanol 70% por 2 min e hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos. Após, foram lavadas em água destilada por 5 vezes e deixadas secar sobre papel de filtro autoclavado, em fluxo laminar, por 30 a 40 minutos, antes de serem semeadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido + higromicina (50 mg/L) (Anexo 8.1). Um teste para determinar o vigor das sementes T_1 também foi conduzido com a introdução de 20 sementes em meio MS sólido sem agente seletivo, por evento.

Após 7 dias, o padrão de segregação observado foi submetido ao teste do Quiquadrado (X^2) de acordo com a seguinte equação:

$$\mathbf{X^2} = \frac{(\text{Or} - \text{Er})^2}{\text{Er}} + \frac{(\text{Os} - \text{Es})^2}{\text{Es}}$$

onde:

Or = Número Observado de Plântulas Resistentes

Er = Número Esperado de Plântulas Resistentes

Os = Número Observado de Plântulas Sensíveis

Es = Número Esperado de Plântulas Sensíveis

Os eventos que apresentaram o padrão de segregação mendeliano esperado para heranças monogênicas (3:1) significativo pelo teste do X^2 (p=0,05) - ou seja, 3 resistentes para 1 sensível - tiveram as plântulas selecionadas e transferidas para vasos de 5 litros - conforme descrito no item 4.10.1 - e cultivados em casa de vegetação. Próximo ao final do estágio vegetativo da geração T₁ (45 dias) - período que antecede a fase reprodutiva - foram realizadas as análises biométricas e a coleta do material utilizado nas análises bioquímicas e moleculares.

4.13 – Análises Biométricas das Linhagens Transgênicas ShSHN1

Os parâmetros de crescimento e desenvolvimento das linhagens de arroz transgênico e tipo selvagem foram acompanhados durante 60 dias de cultivo em casa de vegetação. O peso total (fresco e seco), altura da planta, comprimento e largura da folha bandeira, e o número total de perfilhos, foram os critérios adotados paras as análises biométricas.

Os valores obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias analisadas pelo teste de Dunnet - o qual compara os valores médios obtidos nos tratamentos das linhagens (T_1) com as médias obtidas no grupo controle (WT) - com o auxilio do *software* SAS 9.4 (*Statistical Analysis System*) para um nível de significância estatística de 5% (p<0,05).

4.14 – Análises de Expressão Gênica do Transgene e de Possíveis Genes Alvo do FT ShSHN1 por qPCR

O RNA total de folhas e perfilhos (hastes) das plantas de arroz transgênicas e não transgênicas provenientes da geração T_1 foi isolado utilizando a metodologia de extração por Trizol, conforme descrito no item (4.4). Posteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas e submetidas á síntese de cDNA conforme descrito nos itens 3.4.1 e 3.5, respectivamente.

As eficiências de todos os *primers* utilizados nas reações de qPCR (> 90% ; < 110%) foram estimadas com o auxílio do *software* Lin Reg (Ramakers et al., 2003). Com o intuito de analisar a expressão de possíveis genes alvo que sejam regulados direta ou indiretamente pelo FT SHN de cana-de-açúcar, foram desenhados *primers* específicos para genes relacionados à biossíntese de lignina, celulose, hemicelulose, e complementarmente, cera e cutina (Tabela 6).

Para as análises de expressão por qPCR da progênie em T₁, três indivíduos (réplicas biológicas) de cada evento independente e três replicatas técnicas de cada amostra foram utilizadas. As reações foram conduzidas utilizando o Kit comercial *GoTaq qPCR Master Mix* (PROMEGA) em termociclador Step One Plus (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. Os dados gerados foram analisados com o auxílio do software *Real Time PCR Analyzer* (Applied) e a quantidade relativa das moléculas-alvo foi calculada a partir do método $2-\Delta^{\Delta}CT$

de Livak & Schmittgen (2001). As análises estatísticas foram conduzidas através da comparação entre médias das amostras transgênicas (T_1) e do grupo controle (WT) com o auxílio do *software Relative Expression Software Tool* - REST (Pfaffl, 2002) - para um nível de significância de 5% (p<0,05).

Gene	Locus	Sequência 5' - 3'	Nome	Referência			
OsMYB5863	Os04g50770	F - GACCGAATCGTCCAGTGATG R - CCGTCTTCGTATTGGATTGGT	Transcription Factor MYB 5863	Ambavaram et al., 2011			
OsPAL1	Os12g33610	F - CACAACCAGAGCGTCAACT R - CAGTGCGATGAGGAAAGTAGAG	Phenylalanine ammonia-lyase 1	Liu et al., 2015			
OsCOMT1	Os08g06100	F - GTGGGTAATCATGTCGTTTGC R - AGCAGACAGGTTACATCCATTAG	Caffeic Acid O- Methyltransferase 1	Lin et al., 2006			
OsC4H2	Os01g60450	F - CGCCTCGTCCAGAACTT R - CTAGAACGCTCTCGGCTT	Cinnamate-4-Hydroxylase 2	Yang et al., 2005			
OsCCR1	Os09g08720	F - AAGAGAGGCTCTGTCTGAACTA R - AGGTGAGGCAACATGGAATAC	Cinnamoyl CoA reductase 1	Liu et al., 2015			
OsNST1/2	Os08g02300	F - ACAGAGACAAGACAAGTAAGAA R - ATGGTGGATCTCTCTCTCTCTC	NAC Secondary Wall Thickening Factor 1/2	Ambavaram et			
OsCAD2	Os02g26770	F - GGCAGCAACATCGACGAC R - CGTCAGAGTCTCACACAAACAA	Cinnamyl-Alcohol Dehvdrogenase 2	Hirano et al., 2012			
Os4CL3	Os02g08100	F - AGATATGATGTTGCTGTCCATGA R - AGCAGCATCAACCAACCA	4-coumarate-CoA ligase 3	Liu et al., 2015			
OsC3H	Os05g41440	F - CTGCTGCTGCTGGTTATACA R - CACAAGGCAATTAACACCTCAAA	Coumarate 3-hydroxylase	Liu et al., 2015			
OsHCT	Os04g42250	F - GCTATGCTCTTGCTCCTGTT R - GCTCATTATTGGTTGCTCACATC	Hydroxycinnamoyl- shikimate/quinate transferase	Liu et al., 2015			
OsF5H3	Os10g3684	F - AGGGTATAATTAAGGGTGACAGTG R - TCAGAGGCTGTGCTTATGTG	ferulate 5-hydroxylase 3	Liu et al., 2015			
		CELULOSE					
OsMYB2043	Os02g49986	F - GAGAAGAAATGGTTTGGTGTGTT R - ATGTTTGCTCATAAGGGATGGA	Transcription Factor MYB 2043	Ambavaram et al., 2011			
OsCESA4	Os01g54620	F - CGACTGCTGAGCGACATTT R - CCATCGTCTTCGTCGCATTAG	Cellulose Synthase 4	Wang et al., 2010			
OsCESA7	Os05g08370	F - CGATCCTTTCATTTCGCCTACT R - GGGTAGACCTTGATTGATTGAAGT	Cellulose Synthase 7	Wang et al., 2010			
OsCESA8	Os09g25490	F - TGAGTTCGTGCTATGTTCTTCT R - CCATCTGTCCATTCCCTCTTC	Cellulose Synthase 8	Wang et al., 2010			
		HEMICELULOSE					
OsCSLC2	Os09g25900	F - ATCCAGATTCAGGGCACAAA R - TGGAACTCTATATGGACTGGGTA	Cellulose Synthase-Like 1	Wang et al., 2010			
OsCSLE2	Os02g49332	F - GTGTTGCCACTCTGTATACTCTC R - CCTCCACAGTATTGAAGCTCTTT	Cellulose Synthase-Like 2	Wang et al., 2010			
		C E R A / C U T I N A					
OsCER1	Os04g43270	F - TTAATGTCCTTCAGCGGTACAA R - GTGAATTGGGCGAGGAGTA	Wax Biosynthesis Gene 1	Wang et al., 2012			
OsCER2	Os02g56920	F - TACGACGACCACCACCA R - GCACACACAAGATCACACAATC	Wax Biosynthesis Gene 2	Wang et al., 2012			
OsGPAT4	Os01g63580	F - GCGAGTCACAGCCTCCTA R - AACAATAGATAGAAGCCATGAG	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase	Wang et al., 2012			
OsLACS1	Os12g07110	F - ACTTCTGTGTCTCTGCCATATTC R - TCTTGGCTGGAGGGAGTAA	Long Chain Acyl-Coa Synthetase 1	Wang et al., 2012			

Tabela 6 – *Primers* utilizados para a análise de expressão de possíveis genes alvos do FT ShSHN1 em T₁. Nome, *locus*, sequência e função correlata dos *primers* estão evidenciados.

4.15 – Análises Histoquímicas

Para a análise anatômica qualitativa das linhagens transgênicas de arroz obtidas foram utilizadas amostras do pedúnculo floral. As amostras foram fixadas previamente em solução de FAA 50 (Johansen, 1940), por 24 horas, levadas a bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos, desidratadas em série etílica, e estocadas em etanol 70%. Para evidenciar a presença de lignina nos tecidos vegetais, foram utilizados os reagentes de Mäule e Floroglucinol (Johansen, 1940). As amostras foram seccionadas à mão livre com auxílio de uma lâmina de aço inox descartável.

Para a reação com reagente de Mäule, as secções foram tratadas com permanganato de potássio 0,5% por 2 minutos, seguido por sucessivas lavagens com água destilada e mantidas por 1 minuto em HCl 10%. Posteriormente, as lâminas foram montadas em solução de hidróxido de amônio concentrado.

Para a reação com Floroglucinol, as secções foram tratadas por 5 minutos em Floroglucinol 1% e etanol 95% e montadas em lâminas contendo HCl 25%. A documentação dos resultados foi realizada com a captura de imagens obtidas pela câmera de vídeo Olympus DP71, acoplada ao microscópio Olympus BX 51.

4.16 – Determinação do Conteúdo de Polissacarídeos Estruturais da Parede Celular

A determinação do conteúdo de celulose, hemicelulose e pectina foram realizadas conforme a metodologia descrita por Chen et al. (2002), com algumas modificações realizadas por Llerena-Portilla (2016) (dissertação de mestrado, p. 19, 2016). Para tanto, 150 mg de tecido vegetal liofilizados foram inicialmente homogeneizados em 5 mL de H₂O destilada fria com auxílio do *Vórtex*, seguida de uma centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi lavado sequencialmente com 5 ml de H₂O destilada fria, 5 ml de acetona, e 5 ml de metanol/clorofórmio (1:1, v/v), sendo que a cada etapa foi realizada uma centrifugação para a recuperação do material sólido.

O material recuperado foi seco à temperatura ambiente por 24 horas antes da extração subsequente com solventes. Para a remoção do amido, o material foi tratado com 5 mL de amilase pancreática (2 unidades.ml⁻¹) tipo I-A (Sigma), em

tampão 0,1 M de acetato de sódio (pH: 6,5), por 3 horas, á 37 °C, seguida de centrifugação e nova recuperação do *pellet*. O conteúdo foi tratado três vezes em 3 ml de tampão oxalato de amônio (20 mM; pH 4,0), a 70 °C, durante 1 hora para se obter a fração correspondente às pectinas.

Após nova centrifugação, o *pellet* foi tratado à vácuo com 3 mL de NaOH 0,1 M, por 24 horas, à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi denominado fração I de hemicelulose (Hem I). O *pellet* restante foi tratado por três vezes em 2 mL de NaOH 17,5%, à vácuo, por 8 horas, e após centrifugação, o sobrenadante obtido foi chamado fração 2 de hemicelulose (Hem II). O conteúdo total de hemicelulose foi obtido pela soma das frações (Hem I + Hem II).

O resíduo alcalino insolúvel restante foi lavado sequencialmente com 5 mL de água destilada, 5 mL de ácido acético 1 mM e 5 mL de etanol, e posteriormente secos a 37 °C. Em seguida está fração foi solubilizada em 5 mL de uma de H₂SO₄ 72%, durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida de uma diluição 30x com água destilada para a obtenção da fração referente à celulose.

4.17 – Determinação da Quantidade de Lignina

A quantificação do teor de lignina utilizando a metodologia de Klason foi conduzida seguindo protocolo modificado proposto por Hatfield & Fukushima (2005). Os materiais vegetais provenientes da haste de perfilhos de plantas transgênicas e não transgênicas foram macerados de maneira independente em N_2 liquido até a obtenção de um pó ultrafino, sendo este posteriormente liofilizados. O tecido moído foi lavado com 100 mL de acetona por 8 horas e após a total evaporação da acetona em temperatura ambiente, foram pesados 200 mg de cada amostra e adicionados 3 mL de H_2SO_4 (72%) a cada uma delas.

As amostras foram homogeneizadas em *Vórtex* e mantidas em banho-maria, por 2 horas, a 20 °C, sendo agitadas por 1 min, a cada 10 minutos. Após, o conteúdo foi transferido para tubos de 150 mL e adicionados 112 mL de água ultra pura. Os tubos foram selados e autoclavados (120 °C / 60 min). As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e os hidrolisados foram filtrados a vácuo, sobre papel filtro pré-pesado e previamente seco em estufa a 110 °C. Em seguida, os filtros utilizados foram recolocados para secar em estufa a 110 °C, por 16-18 horas. Por fim, o conteúdo de lignina insolúvel em ácido foi determinado gravimetricamente a partir da diferença entre o peso final (pós-filtração) e inicial (pré-filtração) do filtro.

4.18 – Determinação da Porcentagem de Sacarificação

A determinação do percentual de sacarificação foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por Brown & Torget (1996), com pequenas modificações realizadas por Llerena-Portilla (2016) (dissertação de mestrado, p. 23, 2016). O material vegetal previamente macerado e liofilizado - livre também de açúcares solúveis e amido - foi pesado em tubos *eppendorf* de 1.5 mL. O equivalente a 10 mg de celulose foi utilizado, e a eles, adicionados 500 µl de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,8), 10 µl de azeto de sódio, com o volume completado para 1 mL.

A seguir, a mistura foi aquecida a 50 °C, com subsequente acréscimo de 6 μ l de um *mix* (1:4, v/v) das enzimas celulase (1,2 FPU/10 mg de celulose) e celobiose (1,26 U pNPGU/10mg celulose). Este coquetel foi preparado a partir da celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) e da celobiose de *Aspergillus niger*.

Os tubos contendo as amostras e a solução de reação, foram fechados hermeticamente e incubados em *shaker*, à 50°C e 160 rpm, por 5 dias. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recuperado, e a determinação de glicose foi feita pelo método fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956), com posterior leitura dos valores em espectrofotómetro, a 495 nm, usando uma curva padrão de glicose no intervalo 20-100 ug/m.

5 - Resultados e Discussão
5 - Resultados e Discussão

5.1 – Caracterização do FT ShSHN1 e Análises de Bioinformática

Devido a uma estrutura cromossômica bastante complexa, a cana-de-açúcar ainda não possui seu genoma inteiramente sequenciado e disponível em bancos de dados públicos. Em nossos estudos, foi verificado que todas as prováveis sequências identificadas como SHINE (SHN) depositadas na base de dados de ESTs de cana-de-acúcar (SUCEST) (Vettore et al., 2001) estavam incompletas e, em sua maioria, não possuíam a extremidade terminal do gene (*stop códon* e região 3´UTR). De fato, a sequência nucleotídica codificadora completa referente ao FT SHN de cana-de-açúcar - do códon iniciador da tradução (ATG) até o *stop* códon (TGA) - foi identificada exclusivamente no banco de dados de RNA-seq (Vicentini, Bottcher et al., 2015), com o código de identificação **Locus_27034**. O gene correspondente a esta sequência foi então nomeado de ShSHN1.

A sequência nucleotídica <u>ShSHN1</u> traduzida em aminoácidos (sequência **ShSHN1**), aliada a outras sequências SHN descritas em plantas como Arabidopsis, tomate, sorgo, cevada, switchgrass, milho e arroz, foram utilizadas em análises de alinhamento e na confecção de uma árvore filogenética, objetivando identificar os prováveis ortólogos do FT ShSHN1.

Corroborando dados obtidos por Aharoni et al. (2004) e Santos Brito et al. (2015), o alinhamento (Fig. 10) e a elaboração da árvore filogenética (Fig. 11) possibilitou verificar que a sequência **ShSHN1** se agrupa com outras sequências SHN descritas na literatura. Os membros do clado SHINE são caracterizados por apresentarem o domínio AP2 e os motivos protéicos 'mm' e 'cm' completos (Fig. 10) (Aharoni et al., 2004). A presença destes motivos está diretamente relacionada com a função e atividade de SHN, sendo observados padrões não funcionais em proteínas que possuem o motivo 'cm', e principalmente 'mm' ausentes (Aharoni et al., 2004; Xu et al., 2016).



Figura 10 - Alinhamento múltiplo de aminoácidos referente às sequências SHN de Arabidopsis (At), tomate (SI), cevada (Hv), switchgrass (Pv), milho (Zm), sorgo (Sb), arroz (Os), switchgrass (Pv) e cana-de-açúcar (Sh), utilizando o *software* ClustalX. Os locais evidenciados pelas setas indicam regiões conservadas do domínio AP2 e dos motivos 'mm' e 'cm', exclusivos ao clado SHINE.



Figura 11 – Análise filogenética entre FTs membros do clado SHN em Arabidopsis (At), tomate (SI), milho (Zm), sorgo (Sb), cevada (Hv), switchgrass (Pv), arroz (Os) e canade-açúcar (Sh). A árvore foi gerada a partir do alinhamento entre sequências de aminoácidos utilizando o *software* ClustalX, com visualização no programa MEGA 5.1. *Maximum Likelihood* (bootstrap = 300). Em destaque (*) encontra-se a sequência **ShSHN1** candidata a caracterização funcional.

Na busca em bancos de dados e pela literatura foram identificados dois membros SHN nas monocotiledôneas de genoma completo, tais como milho (ZmEREB46 e ZmEREB145), sorgo (Sb10g023600 e Sb04g006970), switchgrass (PvERF001 e PvERF002) e arroz (Os02g10760 e OsSHN06g40150). Em dicotiledôneas foram identificados três membros SHN em arabidopsis (AtSHN1, AtSHN2 e AtSHN3) e tomate (SISHN1, SISHN2 e SISHN3). A Figura 10 indica que a sequência do gene ShSHN1 está contida no clado SHINE, que é formado por sequências SHN caracterizadas na literatura, tais como AtSHN1-3 (Aharoni et al., 2004), SISHN1-3 (Shi et al., 2012), OsSHN (Trijatmiko, 2005), HvNUD (Taketa et al., 2008) e PvERF001 (Wuddineh et al., 2015). Além disso, foi possível a identificação dos prováveis ortólogos de ShSHN1 que se agruparam no mesmo subgrupo, tais como o de milho (ZmEREB46), sorgo (Sb04g006970), switchgrass (PvERF002) e arroz (Os02g10760).

Provavelmente a cana-de-açúcar também possua o segundo membro de SHN, uma vez que foram identificados nas espécies próximas de genoma completo como arroz, switchgrass, milho e sorgo, porém não foi encontrado nos bancos de dados disponíveis publicamente, e no banco de RNAseq.

5.2 – Amplificação e Clonagem da Sequência ShSHN1

Após a identificação e caracterização *in silico* da sequência referente ao FT ShSHN1, o desenho de *primers* para a amplificação da sua região codificadora foi realizado conforme descrito no item 4.3. Os *primers* ShSHN1-F e ShSHN1-R (Tabela 1) foram desenhados a partir da sequência nucleotídica presente no **Locus_27034** do banco de dados de RNA-seq (Vicentini, Bottcher et al., 2015). Esta sequência possui uma fase de leitura aberta contendo 636 nucleotídeos e 212 aminoácidos. Para a amplificação inicial do fragmento <u>ShSHN1</u> por PCR, um *pool* de cDNAs do genótipo IACSP04-065 foi utilizado como molde (item 4.6.1).

É possível verificar na Figura 12 que o produto da amplificação resultou em uma banda única e de tamanho esperado com aproximadamente 650 pb para o fragmento <u>ShSHN1</u>. Em seguida, a banda foi recortada do gel de agarose, purificada e clonada no vetor comercial *pGEM T-Easy* (Promega).

O vetor contendo o produto da amplificação foi transformado em *E. coli* (Anexo 8.3), e após a obtenção das bactérias transformadas, uma reação de PCR de colônia foi realizada para confirmar a presença do gene nas colônias transformantes (Fig. 13).



Figura 12 – Eletroforese da reação de PCR em gel de agarose mostrando o produto da amplificação da sequência <u>ShSHN1</u>, utilizando os *primers* ShSHN1-F e ShSHN1-R. *M:* Marcador de peso molecular *100pb DNA Ladder* (Bio Labs). *Raia 1:* Produto da amplificação a partir do cDNA da variedade IACSP04-065 (±650pb).



Figura 13 – Eletroforese da reação de PCR em gel de agarose mostrando o produto da amplificação de <u>ShSHN1</u> (±650pb) em 22 colônias de *E. coli* transformadas. *M:* marcador de peso molecular *100pb DNA Ladder* (Bio Labs). *APB-1 a APB-22:* Clones positivos selecionados.

Um total de vinte e dois (22) clones isolados a partir da amplificação do cDNA do genótipo IACSP04-065 foram sequenciados completamente nos sentidos *foward* e *reverse* conforme descrito no item 4.6.3. Dentre as 22 sequências geradas, dezoito (18) apresentaram alta identidade em relação à sequência <u>ShSHN1</u> disponível no bando de dados do RNA-seq e com qualidade suficiente para formação de sequências consenso (*contigs*). Estas dezoito sequências foram agrupadas por alinhamento e três grupos distintos foram observados.

No primeiro grupo (clones APB 6, 7, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 21 e 22), foram obtidos dez (10) clones contendo 628 pb. No segundo grupo, cinco (05) clones continham 642 pb (clones APB 2, 3, 5, 14 e 19). Já no terceiro grupo, a sequência <u>ShSHN1</u> completa esperada de 636 pb foi identificada em três (03) clones (clones APB 1, 8 e 18). O alinhamento subsequente das sequências traduzidas em aminoácidos revelou que os clones dos três grupos apresentaram elevado grau de identidade (\approx 98%) (Anexo 8.6).

Todos os clones de 628 pb obtidos apresentaram a substituição de uma sequência de 23 pb por outra de 15 pb a partir da posição 107 dos transcritos. Esta alteração acabou por originar um *stop códon* (TGA) prematuro na posição 107-109 destes clones, causando um aparente "truncamento" e gerando a tradução de uma proteína incompleta (sem os motivos 'mm' e 'cm'). Já entre os clones de 642 pb analisados, foi observado a presença de uma inserção de 6pb - correspondente aos aminoácidos Alanina e Treonina na posição nucleotídica 271 - mas que aparentemente não comprometem a estrutura da proteína.

Por fim, a análise dos três clones de 636 pb obtidos evidenciaram o êxito na clonagem da sequência codificadora do FT ShSHN1 esperada pelo banco de dados de RNA-seq (Vicentini, Bottcher et al., 2015). Após o alinhamento das sequências nucleotídicas e de aminoácidos de todos os clones obtidos (Anexo 8.6), foi possível classificá-los em três tipos de variantes (Fig. 14).

77



Figura 14 – Esquema ilustrativo dos três tipos de variantes encontradas para o FT ShSHN1. *ShSHN1A:* Variante completa e sem inserções (636 pb). *ShSHN1B:* Variante com inserção de 6pb (642 pb). *ShSHN1C:* Variante "truncada" com a presença do *stop códon* prematuro TGA (628 pb).

Devido a alta frequência observada para as variantes 1B (642 pb) e sobretudo 1C (628 pb), é possível indagar se existe algum papel relevante para estes transcritos na biologia da planta. Porém, neste trabalho, apenas a variante completa (1A - 636 pb) foi selecionada para a análise funcional em transgênicos de arroz. Outros estudos estão sendo conduzidos para esclarecer esta observação.

5.3 – Localização Subcelular do FT ShSHN1

Os fatores de transcrição são elementos capazes de se ligar diretamente à moléculas de DNA e participam ativamente da regulação da expressão gênica (Latchman et al., 2010). Por esse motivo, eles são geralmente encontrados nos núcleos das células eucarióticas. O fato da função de uma proteína estar muitas vezes associada à sua localização subcelular reforça a importância de predições computacionais e detecções da sua atividade *in vivo* na condução de estudos genéticos (Yu et al., 2006). Com o auxílio do *software* Mult Loc (item 4.8), análises computacionais preliminares, utilizando a sequência de aminoácidos **ShSHN1,** indicaram uma probabilidade de 97% de localização nuclear da proteína (Fig. 15.a).

Em plantas, a expressão transiente em protoplastos é uma metodologia eficaz e muito utilizada em estudos que visam detectar a localização subcelular de

proteínas de interesse (Sparkes et al., 2006). Com o intuito de definir a localização subcelular da proteína referente ao FT ShSHN1, e assim conhecer os primeiros indícios de sua atividade, a região do gene ShSHN1 correspondente a região C-terminal da proteína codificada, foi fusionada à região correspondente do N-terminal da proteína GFP, ambas sob o controle do promotor CaMV 35S. Células de tabaco (Nicotiana benthamiana) foram submetidas à transformação transiente com a construção pShSHN1-GFP por Agrobacterium, pelo método de agroinfiltração conforme descrito no item 4.8. Coerentemente às análises computacionais (Fig. 15.a), a fluorescência da GFP foi observada exclusivamente no núcleo das células transformadas com a construção pShSHN1-GFP (Fig. 15.b). Estes resultados corroboram o padrão de detecção nuclear de FTs membros da família AP2/ERF em diversos grupos de plantas dicotiledôneas е monocotiledôneas [i.e. Arabidopsis (Zou et al., 2010; cevada (Jung et al., 2006), trigo (Zahng et al., 2007) e arroz (Hattori et al., 2009; Neelakandan & Wang, 2012)].

Α		
Rank	Localização	Score
1	Nuclear	0.97
2	Peroxissomal	0.01
3	Citoplasmática	0.0
В		
I		IV

6,30 µm

6 30

Figura 15 - Predição computacional e localização subcelular do FT ShSHN1. *A:* Análise computacional utilizando a software Mult Loc. *B:* Expressão transiente em células de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com a construção p<u>ShSHN1</u>-GFP. *I:* Campo claro. *II:* Núcleo celular marcado com DAPI. *III:* Detecção da fluorescência da GFP fusionada à proteína ShSHN1 no núcleo celular. *IV:* Sobreposição de B e C.

6,30 µm

6,30 µm

5.4 – Transformação Genética de Arroz via Agrobacterium

A transferência de genes heterógolos para espécies correlatas fornece uma estratégia interessante para o estudo funcional de genes relacionados a características de interesse agronômico. Nesse contexto, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é considerada uma metodologia eficiente e muito utilizada (Sarangi et al., 2015).

Para o experimento de transformação genética de arroz foi utilizado o vetor final de superexpressão pOE<u>ShSHN1</u> (item 4.7.2). Após o processo de transformação de aproximadamente 70 calos embriogênicos via *Agrobacterium* (item 4.9), foram obtidas 35 plantas de arroz completamente regeneradas após 45 dias de cultivo em meio de cultura seletivo (30 mg/L higromicina) (Fig. 16.d).

Nesta etapa, pôde se verificar uma boa eficiência na transformação genética vegetal (\approx 60%), estando acima dos valores obtidos por Saika & Toki (2009) na transformação da cultivar (cv) Nipponbare (30-40%). Também foi observada uma elevada frequência no desenvolvimento de calos embriogênicos a partir de sementes de arroz cultivadas em meio N6D (Fig. 16.a.b). Com 12 dias de cultivo após a transformação genética, surgiram os primeiros indícios de regeneração vegetal (Fig. 16.c). Com 30 dias de cultivo, aproximadamente 60% dos calos haviam regenerado e foram transferidos para frascos contendo meio líquido seletivo para o desenvolvimento das raízes (Fig. 16.d). As principais etapas envolvidas no processo podem ser visualizadas na Figura 16.



Figura 16 - Principais etapas envolvidas na transformação genética de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. *A-B:* Introdução de sementes de arroz e desenvolvimento de calos embriogênicos em meio de indução (N6D). *C:* Fase inicial de regeneração das plântulas a partir dos calos infectados com a solução agrobacteriana contendo o vetor pOE<u>ShSHN1</u>, com 30 dias de cultivo em meio de regeneração seletivo RE-III. *D:* Completa regeneração das plantas de arroz após 45 dias em meio seletivo de raiz.

5.5 – Confirmação das Linhagens Transgênicas ShSHN1

Dentre as 35 plantas regeneradas em meio seletivo, 15 foram escolhidas e avaliadas por PCR convencional, ainda *in vitro*, para a confirmação da integração do transgene ShSHN1 no genoma vegetal e detecção de possíveis escapes oriundos do processo de transformação. Para tanto, o DNA genômico das plantas transformadas foi extraído e utilizado como molde para as reações de PCR (item 4.10). Os *primers* P-Ubi1-F e T-35S-R (Tabela 3) foram utilizados na detecção da sequência <u>ShSHN1</u> presente no T-DNA das plantas. Todos os eventos foram confirmados como transgênicos (Fig. 17). Isso mostra que a pressão de seleção exercida pelo uso da higromicina (30 mg/L) nos meios de cultura para regeneração e multiplicação se mostrou eficiente, impedindo a regeneração de plantas não transformadas (escapes).



Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para a confirmação dos eventos transgênicos ShSHN1. *M*: Marcador de peso molecular *100 pb DNA Ladder* (Bio Labs). *Raias 1 a 15*: Plantas regeneradas em meio seletivo. *WT*: Planta não transformada. +: Controle positivo da reação de PCR. -: Controle negativo.

5.6 – Aclimatação dos Transgênicos em Casa de Vegetação

Após a confirmação dos eventos transformantes por PCR, as plântulas de arroz cultivadas *in vitro* (Fig. 18.a) foram transferidas para *tubetes* contendo substrato vegetal (Fig. 18.b), sendo cultivadas por 15 dias. Após este período, foram transplantadas paras vasos de 5L e cultivadas em casa de vegetação (item 4.10.1) (Fig. 18.c). Dos quinze eventos obtidos, três não resistiram às mudanças nas condições do novo ambiente (5B, 7A e 24A). Tais perdas foram possivelmente ocasionadas pela fragilidade do sistema radicular e dos perfilhos dessas plantas, que não suportaram as diferenças de temperatura, umidade e luminosidade na transição entre o cultivo *in vitro*, e em casa de vegetação (Pierk, 1997; Sarasan et al., 2006; Yaseen et al., 2013).



Figura 18 - Etapas envolvidas na aclimatação das plantas transgênicas em casa de vegetação. *A:* Plântulas transformadas e completamente regeneradas *in vitro* após 45 dias de cultivo em meio seletivo contendo higromicina. *B:* Fase inicial de aclimatação dos eventos transgênicos em *tubetes* contendo terra e substrato vegetal. *C:* Plantas de arroz transgênicas aclimatadas com 25 dias em casa de vegetação.

5.7 – Nível de Expressão de <u>ShSHN1</u> nas Plantas Transgênicas em T₀

Após a fase de aclimatação dos transgênicos em casa de vegetação, o nível de expressão gênica relativa ao transcrito <u>ShSHN1</u> foi avaliado por qPCR. Como foram desenhados *primers* específicos para a detecção da sequência <u>ShSHN1</u>, que não anelam com os genes endógenos de arroz, nenhum nível de expressão deste transcrito foi detectado nas plantas selvagens (WT). Por esta razão, a análise inicial de expressão relativa dos transgênicos foi calculada utilizando como calibrador (controle) a planta transformada que apresentou o menor nível expressão de ShSHN1 (23A). O gene eEF1a (*elongation factor 1 alpha*), previamente caracterizado como gene normalizador em Arabidopsis e arroz (Jain et al., 2006; Andrade, 2016), foi utilizado nestes cálculos.



Figura 19 – Perfil de expressão relativa de ShSHN1 em 12 plantas de arroz transformadas com a construção pOE<u>ShSHN1</u>. As barras em cinza claro, cinza escuro, e preto indicam a formação de grupos com níveis de expressão diferencial (baixa, média e alta, respectivamente). Os cálculos foram realizados pelo método $2^{\Delta\Delta Ct}$, utilizando como normalizador o gene eFE1a, e como controle (calibrador), amostras do evento que apresentou o menor nível de expressão (23A - linha tracejada).

Dentre os 12 eventos avaliados por qPCR, o que apresentou menor valor de expressão foi o evento de número 23A (Fig. 19). Os eventos 6A, 19A, 20A e 16A foram aqueles que apresentaram o maior nível de expressão dentre todas as plantas analisadas, chegando a estar em alguns casos (16A), até 20 vezes mais expresso em relação ao evento com menor nível de expressão (23A). Os eventos 6A, 19A e 20A também apresentaram valores mais elevados de expressão relativa oscilando entre 8 a 14 vezes mais expresso que o evento 23A.

Esta análise preliminar possibilitou a identificação de plantas transformantes com expressão gênica diferencial, norteando a escolha para as análises subsequentes. Foi possível agrupar os eventos transgênicos em três grupos distintos quanto ao nível relativo de expressão: menores níveis de expressão (23A, 4A, 1A e 13B - cinza claro), expressão intermediaria (11A, 15A, 3A e 27A - cinza escuro) e maiores níveis de expressão (6A, 19A, 20A E 16A - preto) (Fig. 19).

Valores muito elevados nos níveis de expressão do transgene podem indicar a presença de múltiplas cópias do T-DNA no genoma da planta, interferindo na segregação e comprometendo a avaliação funcional do gene em questão. Eventos de cópia única são considerados ideais para a realização de estudos de caracterização funcional (Schubert et al., 2004; Chawla et al., 2006) e foram selecionados na etapa seguinte.

5.8 – Estimativa do Número de Cópias do Transgene ShSHN1

O cálculo do número de cópias de T-DNA inserido no genoma das plantas transgênicas foi estimados por qPCR-TaqMan® (item 4.10.2). Todos os 12 eventos foram avaliados para a construção pOE<u>ShSHN1</u>. As eficiências dos *primers* SPS e *hpt* utilizados na reação (Tabela 5) foram de 90 e 100% respectivamente. O calibrador virtual (coeficiente R1) foi calculado (=0.8) e dentre os doze eventos analisados, onze apresentaram uma única cópia no genoma e apenas um evento apresentou múltiplas cópias (5) (Tabela 7).

O evento que apresentou a inserção de 5 cópias - transgênico 16A - teve um crescimento e desenvolvimento comprometido em relação aos demais, apresentando um aspecto anão (*dwarf*) que impossibilitou a formação das panículas e produção de sementes (dados não mostrados). Isso pode ser explicado pelo fato de que a presença de múltiplas cópias inseridas ao longo do genoma hospedeiro pode levar a desarranjos cromossômicos, silenciamento gênico e efeitos negativos advindos do efeito de posição, sobre a reprodução e o desenvolvimento vegetal (Vergunst & Hooykaas, 1999). Outra possibilidade é que este fenótipo seja resultado de um efeito pleiotrópico da superexpressão de ShSHN1 nas linhagens transgênicas. Mutantes para genes relacionados à síntese de lignina tais como PAL1, C4H, 4CL, CCR, COMT e CAD, exibem efeitos pleiotrópicos comuns como retardo no crescimento, morfologia alterada das folhas, baixa fertilidade e colapso do xilema (Jones et al., 2001; Goujon et al., 2003).

Incertezas na estimativa do número de cópias em um evento transgênico têm sido reportadas em muitos estudos, pela difícil detecção de rearranjos cromossômicos ou pela ocorrência da perda parcial do transgene durante a inserção no genoma hospedeiro (Mason et al., 2012). Contudo, a utilização da metodologia por qPCR-TaqMan[®] pode ser considerada uma técnica eficiente, relativamente simples, que apresenta uma boa sensibilidade e pode servir de alternativa ao uso de metodologias tradicionais como o *Southern Blot* (Xiaoqing, 2014)

Tabela 7 - Estimativa do número de cópias do transgene *hpt* nas plantas de arroz transformadas com a construção pOE<u>ShSHN1</u>, utilizando a metodologia por qPCR-TaqMan[®]. O número estimado de cópias do transgene para cada evento foi determinado pela razão (*Rline /* R1).

Evento	R line	R line / R1	Número de Cópias <i>Hpt</i>
1A	0,912 ± 0,022	1,142	1
3A	0,745 ± 0,074	0,931	1
4A	0,812 ± 0,052	1,015	1
6A	0,721 ± 0,021	0,901	1
11A	0,674 ± 0,067	0,842	1
13B	0,620 ± 0,042	0,775	1
15A	0,756 ± 0,017	0,945	1
16A	$3,849 \pm 0,115$	4,811	5
19A	0,771 ± 0,059	0,963	1
20A	0,913 ± 0,058	1,141	1
23A	1,047 ± 0,043	1,308	1
27A	0,574 ± 0,027	0,717	1

5.9 – Obtenção da Geração T_1 e Análise Genética Quanto ao Padrão de Segregação

As onze plantas em T₀ confirmadas como sendo transgênicas de cópia única, foram cultivadas em casa de vegetação, e suas sementes (progênie T₁) foram coletadas e avaliadas quanto ao padrão de segregação do gene *hpt* para resistência à higromicina (Fig. 20). O teste do X_2 (Tabela 8) mostrou que as onze plantas analisadas apresentaram o padrão de segregação mendeliano para heranças monogênicas (3:1) estatisticamente significativo ($X_2 \le 3,84$).

Tabela 8 - Padrão de segregação referente ao gene *hpt* na progenie T_1 das plantas transgênicas de arroz. Teste do X_2 para segregação mendeliana monogênica 3:1 com nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade ($X_2 \le 3,84$).

Evento	Resistente	Sensível	Total	X ₂ (3:1)
1A	43	18	61	0,667
3A	51	20	71	0,389
4A	57	18	75	0,042
6A	42	20	62	1,745
11A	58	22	80	0,264
13B	41	20	61	1,823
15A	44	21	65	1,825
19A	46	17	63	0,135
20A	45	17	62	0,195
23A	43	18	61	0,667
27A	41	17	58	0,574



Figura 20 - Aspectos do padrão de segregação observado em plântulas transgênicas ShSHN1 resistentes ao antibiótico higromicina, após 7 dias de cultivo em meio seletivo (MS₃). *T6-A, T19-A, T20-A*: Plântulas transgênicas exibindo o padrão de segregação mendeliano para heranças monogênicas (3 resistentes: 1 sensível). *WT:* Sementes de plantas de arroz não transformadas (controle positivo).

5.10 – Escolha das Linhagens Transgênicas em T1 para as Análises Biométricas Moleculares e Bioquímicas

Para a escolha das linhagens em T₁ que seriam submetidas às análises biométricas, moleculares e bioquímicas, os seguintes critérios foram considerados: i-) níveis mais elevados de expressão de ShSHN1 na geração T₀ (Fig. 19); ii-) plantas com uma cópia única do transgene; iii-) eventos que apresentaram o padrão de segregação mendeliano para heranças monogênicas. Atendendo a estes critérios, as linhagens 3A, 27A, 6A, 19A e 20A (Fig. 22) foram escolhidas para o cultivo em casa de vegetação, com seis indivíduos de cada linhagem.

Após 30 dias de cultivo, foi realizada uma nova etapa de quantificação e verificação da estabilidade nos níveis de expressão de ShSHN1 (item 4.10.1). Coerentemente, foi verificado que as linhagens mais expressas em T₁ foram aquelas derivadas dos transgênicos primários com maiores níveis de expressão em T₀ (6A, 19A, 20A) (Fig. 19 e Fig. 21).

Assim, três indivíduos de cada uma das três linhagens independentes que exibiram os maiores níveis de expressão, tanto em T_0 quanto em T_1 , foram escolhidas para a continuidade dos experimentos (6A – indivíduos 1, 4 e 5; 19A – indivíduos 2, 5 e 6; 20A – indivíduos 1,5 e 6).



Figura 21 - Perfil de expressão relativa de ShSHN1 em 5 linhagens transgênicas independentes em T₁ (3A, 27A, 6A, 19A e 20A). As barras em cinza representam as os indíviduos da mesma linhagem que apresentaram os maiores níveis de expressão (6A-1, 4 e 5; 19A-2, 5 e 6; 20A-1, 5 e 6). Os cálculos foram realizados pelo método $2^{\Delta\Delta Ct}$, utilizando como normalizador o gene eFE1a, e como calibrador, amostras do evento que apresentou o menor nível de expressão [(3A-4) - linha tracejada)].



Figura 22 - Cultivo em T_1 das linhagens transgênicas ShSHN1 com seis indivíduos por progênie. Aspecto das plantas com 45 dias em casa de vegetação. As linhagens que apresentaram os maiores níveis de expressão de ShSHN1, cópia única e segregação mendeliana 3:1, foram selecionadas (3A, 6A, 19A, 20A e 27A).

5.11 – Perfis de Expressão de Possíveis Genes Alvo de ShSHN1

Para avaliar o efeito da superexpressão do FT ShSHN1 nas linhagens transgênicas de arroz em níveis moleculares de indução e repressão de genes, uma série de experimentos de qPCR foram conduzidos. Os possíveis genes alvo de ShSHN1 são relacionados à formação da parede celular, como genes de síntese de lignina, celulose, e cera e cutina (Aharoni et al., 2004; Ambavaram et al., 2011) (Tabela 6). Para isso, amostras da haste do perfilho e folhas de plantas transgênicas e não transgênicas foram selecionadas e utilizadas conforme descrito no item 4.14.

5.11.1 - Genes do Metabolismo de Lignina

A análise dos dados de qPCR mostrou que os níveis de expressão dos genes relacionados ao metabolismo de lignina (OsPAL1, OsC4H2, Os4CL3, OsHCT, OsC3H, OsCCR1, OsF5H3, OsCOMT1 e OsCAD2) foram significativamente reprimidos em relação às plantas controle (WT) tanto em folhas, quanto em perfilhos nas três linhagens ShSHN1 avaliadas (Fig. 23).

Além disso, o fator de transcrição OsNST1/2, cujo homólogo de Arabidopis atua como regulador mestre na coordenação da expressão de alguns FTs da via de lignina (Zhong et al., 2008), também apresentou níveis de expressão reduzidos (Fig. 23). De modo similar, o nível de expressão do FT OsMYB58/63, que classicamente está relacionado à biossíntese de lignina em Arabidopsis (Zhou et al., 2009; Dubos et al., 2010), e que recentemente foi associado à formação de celulose em arroz (Noda et al., 2015), apresentou-se reduzido em ambos os tecidos quando comparados ao WT.

Estes resultados corroboram os dados obtidos por Ambavaram et al. (2011), os quais mostraram que a superexpressão de AtSHN2 em arroz, leva a uma redução na expressão de genes (CADs e 4CLs) e FTs (OsNTS1/2 e MYB58/63) relacionados à síntese da lignina. Além disso, recentemente foi demonstrado que o homólogo putativo de AtSHN2 em switchgrass (PvERF001) também atua negativamente na modulação de genes e fatores de transcrição relacionados à via da lignina, tais como PvC4H, PvPAL1, PvMYB48 e PvNST1 (Wuddineh et al., 2015). Juntos, esses resultados fornecem evidências de que a superexpressão de SHN atua de maneira direta (interagindo especificamente com os genes da via), ou indireta (por meio de interações com outros FTs reguladores), na regulação negativa dos genes da biossíntese de lignina. Estudos adicionais poderão evidenciar quais são de fato os tipos de interação existentes e fornecer um melhor entendimento sobre o papel do FT ShSHN1 na modulação desta via.



Figura 23 - Perfil de expressão de genes relacionados à biossíntese de lignina em três linhagens ShSHN1 independentes. As colunas em cinza claro e cinza escuro representam, respectivamente, amostras de folhas e hastes de perfilhos. Os cálculos foram conduzidos e os gráficos obtidos através da comparação entre as médias amostrais das linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) e do grupo controle (WT), com o auxílio do *software* REST (Pfaffl, 2002). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam níveis de significância (p≤0,05).

5.11.2 - Genes do Metabolismo de Celulose e Hemicelulose

Similarmente ao padrão de expressão observado para os genes da biossíntese de lignina, os genes avaliados da via da síntese da celulose (OsCESA4, OsCESA7, OsCESA8) também foram reprimidos em folhas e perfilhos das linhagens ShSHN1 (Fig. 24). Contudo, dois genes, que estão relacionados ao metabolismo de hemicelulose - OsCLC2 e OsCLE2 (Wang et al., 2010) - tiveram sua expressão reprimida em perfilhos, porém induzida em folhas. Além disso, os FTs OsMYB20/43 e OsMYB58/63, que apresentam uma relação direta com a modulação de genes de celulose em arroz (Amabavaram et al., 2011; Noda et al., 2015), também foram reprimidos nos perfilhos, mas ligeiramente induzido nas folhas (Fig. 24). Tais resultados sugerem que a superexpressão de ShSHN1 tem efeito não só na modulação dos níveis de expressão de genes de celulose e hemicelulose analisados, mas também tem uma possível relação tecidoespecífica. O que já foi mostrado em outros estudos para FTs NAC, como NST1 e SND1 (Mitsuda et al., 2007; Zhong, & Ye, 2007). Porém, essa relação tecidoespecífica precisa ser melhor estudada e compreendida. Vale ressaltar que o resultado obtido aqui, de repressão dos níveis de expressão de genes da via de celulose, é antagônico aos dados obtidos por Ambavaram et al. (2011). Isto é, a superexpressão de AtSHN2 em transgênicos de arroz, induziu a expressão dos genes OsCESA4, OsCESA7, OsCESA8, OsCLC2 e OsCLE2 (Ambavaram et al., 2011). Por outro lado, corroborando parte dos resultados obtidos, foi demonstrado que a superexpressão de PvERF001 (homólogo putativo de AtSHN2) em switchgrass levou a uma redução no padrão de expressão de genes de celulose e hemicelulose tais como PvCSLC2 e PvCESA4. Contúdo, a expressão de genes como PvCESA1, PvCESA9 e PvMYB20/43, permaneceram inalteradas em relação ao WT (Wuddineh et al., 2015). Estes resultados reforçam a necessidade de se validar FTs específicos para cada espécie a ser estudada, pois os mecanismos de ação de um FT em uma espécie, podem não se repetir integralmente em outra (Ohman et al., 2012; Shen et al., 2012). Além disso, as diferentes estratégias para a superexpressão dos FTs SHN adotadas nestes trabalhos (i.e. tipos de promotores utilizados, superexpressão heteróloga (Ambavaram et al., 2011) x superexpressão homóloga (Wuddineh et al., 2015), além dos estágios de desenvolvimento e material vegetal utilizado nas análises, podem também ter contribuído com as diferenças observadas.

93



Figura 24 - Perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de celulose e hemicelulose em três linhagens ShSHN1 independentes. As colunas em cinza claro e cinza escuro representam, respectivamente, amostras de folhas e hastes de perfilhos. Os cálculos foram conduzidos e os gráficos obtidos através da comparação entre as médias amostrais das linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) e do grupo controle (WT), com o auxílio do *software* REST (Pfaffl, 2002). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam níveis de significância ($p \le 0,05$).

5.11.3 - Genes do Metabolismo de Cera/Cutina

Complementarmente, foram realizadas análises de expressão de genes referentes ao metabolismo de cera e cutina (CER1, CER2, GPAT e LACS1) que estão relacionados à ação de FTs SHN em diversos grupos de plantas (Aharoni et al., 2004; Wang et al., 2012, Wuddineh et al., 2015). Foi observado que padrão de expressão dos quatro genes analisados (OsCER1, OsCER2, OsGPAT4 e OsLACS1) foi alterado nas linhagens ShSHN1 em relação ao WT. A modulação destes genes foi reprimida em perfilhos e induzida nas folhas, corroborando as evidencias que relacionam a atuação de membros do grupo SHN à modulação

positiva da síntese de cera e cutina nas folhas de Arabidopsis, cevada, arroz e switchgrass (Aharoni et al., 2004; Kannangara et al, 2007; Takeda et al., 2008; Wang et al., 2012; Wuddineh et a.l, 2015). Contudo, estudos adicionais sobre a morfologia e composição das células nas linhagens ShSHN1 em relação ao conteúdo de cera e cutina, bem como sua possível relação em resposta ao stress hídrico, devem ser conduzidas para suportar estas observações.



Figura 25 - Perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de cera e cutina em três linhagens ShSHN1 independentes. As colunas em cinza claro e cinza escuro representam, respectivamente, amostras de folhas e hastes de perfilhos. Os cálculos foram conduzidos e os gráficos obtidos através da comparação entre as médias amostrais das linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) e do grupo controle (WT), com o auxílio do *software* REST (Pfaffl, 2002). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam níveis de significância (p≤0,05).

5.12 – Caracterização Biométrica das Linhagens Transgênicas ShSHN1

Para avaliar os efeitos da superexpressão de ShSHN1 no crescimento e desenvolvimento das plantas transgênicas, os seguintes parâmetros foram utilizados: peso total (fresco e seco), altura da planta, comprimento e diâmetro da folha bandeira, e número total de perfilhos. Durante os 120 dias de cultivo em casa de vegetação, todas as três linhagens e indivíduos de cada progênie analisados - 18 plantas no total - apresentaram um crescimento e

desenvolvimento normais, com formação de panículas e produção de sementes.

A análise dos dados biométricos mostrou que as linhagens 19A e 20A apresentaram um aumento significativo no número total de perfilhos e altura máxima das plantas - apresentando valores até 20% e 40% maiores, respectivamente, quando comparadas ao WT (Fig. 26.a). De modo similar, estas duas linhagens também apresentaram um aumento significativo no comprimento e diâmetro da folha bandeira (Fig. 26.c-d), além de um expressivo aumento em até 200% em relação à biomassa seca, quando comparadas ao WT (Fig. 26.e-f). Tais resultados diferem dos dados obtidos por Ambavaram et al. (2011) que demonstraram que as plantas transgênicas AtSHN2 em arroz não apresentaram diferenças significativas nos padrões de crescimento e conteúdo de biomassa.

Por outro lado, corroboram os recentes dados obtidos por Wuddineh et al. (2015) na superexpressão de PvERF001 em switchgrass. Plantas transgênicas exibiram um aumento total na altura (15-35%), diâmetro das folhas (15-45%) e peso seco total (20-50%), quando comparadas ao grupo controle. Neste sentido, tanto a superexpressão de ShSHN1 em arroz, quanto de PvERF001 em switchgrass, parecem correlacionar-se diretamente com o aumento substancial nos parâmetros biométricos e conteúdo de biomassa observados (Fig. 26), evidenciando uma característica extremamente favorável para a produção e processamento de biocombustíveis.



Figura 26 - Parâmetros biométricos e aspecto morfológico das plantas transgênicas ShSHN1. *A*: Número de perfilhos. *B*: Altura máxima da planta. *C*: Comprimento da folha bandeira. *D*: Diâmetro da folha bandeira. *E*: Peso fresco. *F*: Peso seco. *G*: Aspecto visual das linhagens transgênicas (6A, 19A, 20A) e controle (WT). As barras indicam o desvio padrão e os asteriscos indicam os níveis de significância (ANOVA-Dunnet. * $p \le 0,05$).

5.13 – Análises Histoquímicas

O efeito da repressão nos níveis de transcrição de genes relacionados à síntese de lignina nas linhagens ShSHN1 foi primeiramente avaliado por análises histoquímicas em cortes histológicos de pedúnculos florais (região com intensa lignificação). A identificação de lignina total foi realizada com o reagente Fluoroglucinol-HCL, enquanto o reagente de Maule foi usado para observar diferenças entre a localização de lignina S e G (Fig. 27). A lignina S é marcada com uma cor vermelho púrpura, enquanto a lignina G é evidenciada pela cor amarela. Um deslocamento para amarelo acastanhado é indicativo de uma diminuição em lignina S e aumento de lignina G (Yamamoto, 1990). O exame das linhagens transgênicas ShSHN1 revelou um aumento global na cor amarelocastanho notadamente nas fibras de esclerênquima (f) e células epidérmicas (e) dos pedúnculos florais, mas não houve diferenças significativamente observáveis na coloração vermelha (Fig. 27a). Estes resultados podem ser um indício de que a repressão de genes como OsCOMT1 e OsF5H, os quais são cruciais para a produção da subunidade S da lignina, possam ser responsáveis por esse padrão. Porém estudos quantitativos adicionais para a determinação da relação S/G nas linhagens ShSHN1 estão sendo realizados para suportar estas evidências. Em relação ao conteúdo total de lignina visualizado por meio da coloração com Fluoroglucinol, os aspectos observados entre as linhagens ShSHN1 e WT não foram conclusivos (Fig. 27b).



Figura 27 - Caracterização histoquímica das linhagens ShSHN1. Cortes transversais de pedúnculos florais corados com o reagente Maule (**A**) e Fluoroglucinol (**B**). Secções visualizadas por microscopia de luz. **WT:** Plantas controle. **T6, T19A e T20A:** Plantas transgênicas. (e) epiderme; (f) fibras; (fv) feixes vasculares; (p) células parenquimais. Barras = 20 µm.

5.14 – Dosagem do Conteúdo de Lignina

A metodologia de Klason foi utilizada para a quantificação do teor de lignina presente nas linhagens transgênicas ShSHN1 em relação ao WT (item 4.15).

A análise dos dados constatou que as três linhagens transgênicas (6A, 19A e 20A) apresentaram um conteúdo de lignina menor do que as plantas controle. Com uma diferença significativa de até 36% no conteúdo de lignina insolúvel, e 40% no conteúdo de lignina total. A linhagem 20A foi a que apresentou as maiores reduções, seguidas pelas linhagens 19A e 6A, respectivamente (Fig. 28). Estes resultados foram compatíveis com os níveis de expressão reduzidos obtidos para os genes da biossíntese de lignina avaliados por qPCR, e corroboram os dados obtidos por Ambavaram et al. (2011), os quais obtiveram um conteúdo de lignina reduzido em até 50% nas linhagens que expressão de PvERF001 em switchgrass não levou a alterações significativas no conteúdo de lignina nas linhagens transgênicas, apesar de alguns genes da via estarem levemente reprimidos (Wuddineh et al., 2015).

Além disso, pôde-se observar que as linhagens com os maiores níveis de expressão de ShSHN1 (19A e 20A) (Fig. 21), foram as mais responsivas em relação à diminuição do conteúdo de lignina nos tecidos vegetais, indicando uma relação proporcional entre o nível de expressão do ShSHN1 e a regulação negativa destes genes (repressão). Esta relação proporcional entre o nível de expressão de SHN, com o impacto negativo na quantidade de lignina dos organismos geneticamente modificados, pode explicar a razão entre as diferenças observadas nos diferentes sistemas estudados, tendo em vista os trabalhos de Ambavaram et al. (2011) em arroz e Wuddineh et al. (2015) em switchgrass.



Figura 28 - Conteúdo médio de lignina (insolúvel e total) nas linhagens transgênicas ShSHN1 (6A, 19A e 20A) e grupo controle (WT). As barras erticais indicam o erro padrão das médias de triplicatas independentes e os asteriscos indicam o nível de significância (ANOVA-Tukey. *p≤0,05).

5.15 – Determinação do Conteúdo de Polissacarídeos Estruturais da Parede Celular

O conteúdo dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina nas linhagens ShSHN1 foram obtidos pela metodologia descrita por Chen et al. (2002) (item 4.15). Foi observado que o conteúdo de celulose total das plantas transgênicas ShSHN1 apresentou-se praticamente invariável em relação ao WT nas linhagens 6A, 19A e 20A (Fig. 29A). Tais resultados contrastam com os níveis de expressão reduzidos obtidos para os genes da biossíntese de celulose avaliados por qPCR (OsCESA4, OsCESA7 e OsCESA8), e sugerem que outros membros desta família gênica (i.e. OsCESA1-3, OsCESA5-6 e OsCESA9-12 - Wang et al., 2010) possam estar compensando essa redução. Além disso, o fato de os níveis de expressão, obtidos por qPCR, serem relativos uma região restrita das folhas e das hastes dos perfilhos, enquanto que o conteúdo dos polissacarídeos estruturais ter sido obtido utilizando o material proveniente de todo o perfilho (haste + folhas), podem ter contribuído com essa diferença.

De modo similar, também foi observado que o conteúdo de hemicelulose nas três linhagens transgênicas não variou significativamente em relação ao WT, apesar dos genes CSLC2 e CSLE2 estarem induzidos em folhas e reprimidos em perfilhos (Fig. 29.b). Por outro lado, em relação à quantidade de pectina, foi constatado um aumento significativo do conteúdo médio em todas as linhagens ShSHN1 analisadas, atingindo níveis até 200% maiores na linhagem 20A em relação ao WT (Fig. 29.c). Além disso, pôde-se observar uma relação diretamente proporcional, na qual as linhagens com os maiores níveis de expressão de ShSHN1 (19A e 20A), foram as mais responsivas em relação à ao aumento do conteúdo de pectinas obtido. Interessante, este foi o primeiro relato descrito que correlaciona a atuação de um membro do clado SHINE com a síntese de polissacarídeos pécticos presentes na parede celular, apresentando uma potencial relevância de aplicação que amplia as possibilidades de utilização do FT ShSHN1 no aprimoramento de matérias primas bioenergéticas.



Figura 29 - Conteúdo médio dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina nas linhagens transgênicas ShSHN1 (6A, 19A e 20A) e grupo controle (WT). *A:* Celulose. *B:* Hemicelulose. *C:* Pectina. As barras verticais indicam o erro padrão das médias de triplicatas independentes e os asteriscos indicam o nível de significância (ANOVA-Tukey. *p≤0,05).

5.16 – Determinação do Percentual de Sacarificação

Para a determinação do percentual de sacarificação nas linhagens transgênicas ShSHN1, a metodologia descrita por Brown & Torget (1996) foi utilizada seguindo os parâmetros descritos no item 4.17. Nas três linhagens transgênicas analisadas, foi observado um aumento nas porcentagens de sacarificação obtidas. Com significância estatística, as taxas de sacarificação apresentaram um aumentou de aproximadamente 25% na linhagem 19A, e até 50% na linhagem 20A, quando comparadas ao WT (Fig. 30). Estes resultados são superiores aos obtidos pela supressão de genes da biossíntese de lignina como COMT em canade-açúcar (20-35%) e switchgrass (20%) (Jung, Altpeter et al., 2012a, 2013b; Yee et al., 2010). De modo similar, a supressão de outro gene da via em switgrass (CAD), levou a um aumento considerável de até 35% na eficiência de sacarificação (Fu et al., 2011), porém ainda inferiores aos níveis obtidos. Por outro lado, a supressão de 4CL por RNAi em cana-de-açúcar conduziu a eficiências de sacarificação um pouco superiores às descritas aqui (50-70%) (Jung et al., 2016). Os resultados aqui obtidos reforçam o potencial de aplicação do FT ShSHN1 na obtenção de matérias primas que possam ser utilizadas na produção de biocombustíveis como o etanol 2G.

Novamente, foi possível constatar que as linhagens com os maiores níveis de expressão de ShSHN1 (19A e 20A), foram as mais responsivas em relação ao aumento no percentual de sacarificação, o que é condizente com a diminuição do conteúdo de lignina observado (Fig. 19, Fig.28 e Fig.30).



Figura 30 - Percentual de sacarificação nas linhagens transgênicas ShSHN1 (6A, 19A e 20A) e grupo controle (WT). As barras verticais indicam o erro padrão das médias de triplicatas independentes e os asteriscos indicam o nível de significância (ANOVA-Tukey. *p \leq 0,05).

5.17 – A superexpressão do FT ShSHN1 em Arroz Atua Negativamente na Modulação de Genes da Biossíntese de Lignina, Reduzindo o Conteúdo e Aumentando a Eficiência do Processo de Sacarificação

A superexpressão do FT ShSHN1 nas linhagens transgênicas de arroz obtidas levou a uma redução dos níveis de expressão de todos os genes envolvidos na via de síntese da lignina analisados (OsPAL1, OsC4H2, Os4CL3, OsHCT, OsC3H, OsCCR1, OsF5H3, OsCOMT1 e OsCAD2). Em geral, a modificação na expressão dos genes que participam do início da via de biossíntese dos monolignóis (PAL, C4H, CL4, HCT e C3H - Fig. 4) alteram a quantidade de lignina depositada na parede celular vegetal, enquanto que modificações na composição dos monômeros S e G estão relacionadas principalmente à atividade das enzimas F5H e COMT (Gallego-Giraldo et al., 2011; Voelker et al., 2011; Yoon & An, 2015).

Quando a expressão dos genes da família PAL (Elkind et al., 1996; Song & Wang, 2011), C4H (Bell-Lelong et al., 1997, Schilmiller et al., 2009), 4CL (Yan et al., 2015; Voelker et al., 2011), HCT e C3H (Franke et al., 2002; Pu, Chen et al., 2009) é drasticamente reduzida ou interrompida, pode ocorrer a redução de crescimento vegetativo, o comprometimento no desenvolvimento dos tecidos vasculares, a má formação foliar, com consequente comprometimento da fotossíntese e do desenvolvimento da planta (nanismo), além de esterilidade. Por outro lado, em nossos resultados, foi verificado que apesar dos níveis reduzidos de expressão dos genes OsPAL1, OsC4H, OsCL43, OsHCT e OsC3H nos perfilhos e folhas das linhagens transgênicas ShSHN1, não foram constatadas alterações negativas no crescimento da planta, formação dos órgãos florais e produção de sementes. Além disso, apesar da expressão de OsC4H2 estar drasticamente reduzida nos tecidos foliares da linhagem ShSHN1 20A (Fig. 23), não foram observados comprometimentos no desenvolvimento das folhas. Ao contrário, um aumento significativo no comprimento e diâmetro da folha bandeira foi constatado (Fig. 26c.d). Esta relação é coerente com o fato de que a redução nos níveis de expressão dos genes PAL, C4H, 4CL, HCT e C3H podem estar relacionados com a diminuição de até 50% do conteúdo de lignina das linhagens ShSHN1 (Fig. 28), o que pode tornar a folhas mais maleáveis (menor rigidez), conferindo maior elasticidade e potencial de elongação celular (Fan et al., 2006). Contudo, estudos adicionais estão sendo conduzidos para suportar esta hipótese.

Os genes F5H e COMT possuem um papel chave na formação do monômero S da lignina, estando relacionados com modificações na razão S/G e a eficiencia de sacarificação. Em Arabidopsis, mutantes deletérios para F5H não produzem a unidades S da lignina (García et al., 2014), enquanto a superexpressão de F5H em diversos espécies de plantas resulta em ligninas altamente enriquecidas em subunidades S (Franke et al., 2000; Wang & Chapple, 2015). Além disso, mutantes para COMT1 em Arabidopsis, tabaco e salvia, apresentam uma maior taxa de sacarificação com uma constituição da lignina praticamente livres de subunidades S (Goujon et al., 2003). Ademais, os genes HCT e C3H são responsáveis por convergir a via da lignina para a biossíntese das unidades G e S da lignina, contrário ao fluxo de síntese da unidade H. Diante dos papéis destes genes na via da biossíntese da lignina, a diminuição nos níveis de expressão de OsHCT, OsC3H, OsF5H3 e OsCOMT1 observados nas linhagens ShSHN1, pode estar contribuindo não só com a redução do conteúdo total de lignina, mas também interferindo em sua composição, dependendo do nível repressão individual de cada gene.

Em suma, condizente com os dados de expressão gênica, foi constatado que o conteúdo médio de lignina em duas das três linhagens ShSHN1 avaliadas (19A e 20A), foi significativamente reduzido quando comparados ao WT (Fig. 27). A diminuição da lignina pode estar correlacionada com o aumento significativo na eficiência de sacarificação obtida (Fig. 29), uma vez que a lignina dificulta a solubilização, e os processos enzimáticos de quebra (sacarificação) e fermentação dos açúcares constituintes da parede celular, comprometendo a eficiência na conversão de biomassa em biocombustíveis como o etanol 2G (Chen & Dixon, 2007; Weng et al., 2008; Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Estudos adicionais estão sendo conduzidos para avaliar a composição dos monômeros H, G e S e da razão S/G, e poderão elucidar se a contribuição na melhora da eficiecia da sacarificação pelo SHINE está relacionada apenas com a redução da lignina ou se a alteração da composição da lignina também está colaborando.

O padrão de redução moderado observado nos níveis de expressão dos genes avaliados, em vez de uma redução drástica ou silenciamento total de um gene específico, permitiram o desenvolvimento apropriado das linhagens ShSHN1, sem efeitos negativos visíveis. Outro aspecto interessante observado, é a relação proporcional entre níveis de expressão de ShSHN1 nas linhagens transgênicas em comparação com a redução na expressão dos genes da via de lignina e no conteúdo de lignina (Fig. 19 e Fig. 23). Esta relação estreita sugere fortemente que o FT ShSHN1 atua na modulação do padrão de expressão dos genes relacionados à via biossintética da lignina. Além disso, os resultados de interação direta entre o homólogo de ShSHN1 (AtSHN2) e as regiões promotoras dos FTs NACs e MYBs de lignina obtidos anteriormente por Ambavaram et al. (2011) em arroz, contribuem com esta suposição.

5.18 – Linhagens ShSHN1 Apresentam Ganho de Biomassa, Aumento nos Parâmetros Biométricos e Conteúdo de Pectinas da Parede Celular

Os polissacarídeos da parede celular tais como celulose, hemicelulose e pectinas são a maior fonte de energia presente na biomassa vegetal, podendo ser convertidos em açucares fermentáveis para a produção de biocombustíveis líquidos como o etanol 2G (Phitsuwan et al., 2013).

Em nossos resultados foram observados padrões de crescimento significativamente aumentados, com consequente aumento no acúmulo de biomassa nas linhagens ShSHN1 quando comparados ao WT (Fig. 26.e.f). Contudo, o conteúdo de celulose e hemicelulose permaneceram inalterados (Fig. 28.a.b). Por outro lado, foi observado um grande aumento no conteúdo total de pectinas nas linhagens transgênicas - alcançando níveis entre 85% e 200% superiores ao WT. As pectinas são os polissacarídeos mais heterogêneos presentes nas plantas e são os constituintes de até 35% das paredes primárias em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas, porém representam apenas cerca de 5-10% da parede celular primária nas gramíneas (Mohnen et al., 2008). As pectinas são sintetizadas no complexo de Golgi e conduzidas sob a forma metil-esterificada até a parede celular por intermédio de glicosiltrasferases (Mohnen et al., 2008). Elas podem ser de-metil-esterificadas pela atividade específica de metil-esterases e formar redes intermoleculares com os demais polissacarídeos da parede celular, auxiliando na manutenção e coesão das paredes celulares. A super expressão de um inibidor de enzimas metil-esterases (PME-I) resultou em um aumento da biomassa em arabidopsis e trigo transgênico, resultantes do aumento no conteúdo de pectinas livres nas paredes celulares (Lionetti et al., 2010), o que sugere que o aumento da biomassa nas plantas de arroz transgênicas ShSHN1 pode estar relacionado com as pectinas
livres nas paredes celulares. Estas observações podem ser apoiadas pelo fato de que a apesar do conteúdo de celulose e hemicelulose não variar nas linhagens ShSHN1, e o conteúdo de lignina estar significativamente reduzido, as plantas ainda assim apresentaram um aumento significativo nos parâmetros biométricos como altura máxima, largura e comprimento da folha bandeira, além de um acréscimo no peso fresco e seco total (Fig. 28).

Além disso, como a matriz de pectinas controla a porosidade da parede celular e, portanto, o movimento de macromoléculas (incluindo enzimas) e íons (Mohen, 2008), o aumento no conteúdo de pectinas observado nas linhagens ShSHN1 pode ter contribuído com uma maior acessibilidade aos açúcares da parede celular pelas enzimas celulases e celobioses, e que aliados à redução do conteúdo de lignina, podem ter proporcionado o incremento significativo nas eficiências de sacarificação obtidas (Fig. 29).É importante ressaltar que esta é a primeira vez em que a atuação de um membro da família dos FTs SHN foi relacionada com o acúmulo de pectinas. Até então, as correlações existentes envolviam a síntese de outros constituintes, tais como lignina, celulose, além de cera e cutina (Aharoni et al., 2004; Taketa et al., 2008; Ambavaram et al., 2011; Shi et al., 2013). Contudo, estudos sobre a morfologia e composição bioquímica celulares, bem como sua possível relação com o aumento da biomassa observado, devem ser conduzidas para embasar estas observações.

Tal como o amido e a sacarose, as pectinas são em grande parte solúveis em água e relativamente fáceis de se degradarem em comparação com outros componentes da parede celular (Xiao et al., 2013). Isso evidencia o potencial que matérias primas enriquecidas em pectinas possam ter na conversão de biomassa em biocombustíveis como o etanol, sobretudo em gramíneas onde sua presença é reduzida. O uso deste tipo de recursos também exigirá métodos de sacarificação e fermentação otimizados para os tipos de açúcares que as constituem, e muitos os esforços já estão em andamento para gerar linhagens microbianas de bioprocessamento adaptadas a estes materiais ricos em pectina (Edwards et al., 2012). Nesse sentido, os resultados aqui obtidos podem inspirar e impulsionar o estudo e a utilização alternativa de pectinas para a produção de biocombustíveis, apresentando-se como um componente adicional que eleva o valor energético da biomassa e contribuí para uma maior eficiência nos processos de obtenção de combustíveis líquidos a partir de matérias primas renováveis.

108

5.19 – O FT ShSHN1 Atua Como Modulador Transcricional de Genes da Parede Celular Apresentando Potencial de Aplicação no Desenvolvimento de Matérias Primas Aprimoradas para a Produção de Biocombustíveis

Os fatores de transcrição membros do grupo AP2/ERF constituem uma das maiores superfamílias de proteínas regulatórias em plantas. Por estarem relacionados a uma grande variedade de processos de crescimento e desenvolvimento vegetais, podem ser alvos potenciais para a engenharia genética em diversas culturas, visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes. Dentre eles, os membros do grupo SHN foram caracterizados em várias espécies de plantas, e suas potenciais aplicações biotecnológicas no melhoramento de culturas têm focado principalmente na tolerância ao estresse biótico e abiótico (Aharoni et al., 2004a, 2011b; Kannangara et al, 2007; Yan et a., 2011; Xu et al., 2016; Shi et al., 2013; Al-Abdallat, Hasan et al., 2014; Buxdorf, Levy et al., 2014; Lashbrooke et al., 2015; Takeda et al., 2008; Wang et al., 2012). Porém, poucos esforços têm sido realizados para utilizar este potencial no melhoramento genético de matérias primas bioenergéticas como a cana-de-açúcar (Bhatia e Bosch, 2014). Apesar de estudos recentes relacionarem a atuação de alguns destes genes no desenvolvimento da parede celular vegetal em gramíneas como arroz e switchgrass (Ambavaram et al., 2011; Wuddineh et al., 2015), até então ainda não havia sido caracterizado nenhum membro desta classe de TFs em cana-de-açúcar.

Com base em análises funcionais em arroz, foi inicialmente proposto que o FT AtSHN2 possui uma associação direta com as vias regulatórias de celulose e lignina durante a biossíntese da parede celular, ativando a primeira via e reprimindo a segunda (Ambavaram et al., 2011). Neste sentido, a superexpressão de ShSHN1 (homólogo de AtSHN2) em plantas transgênicas de arroz teve como intuito principal verificar se os mecanismos de ação deste FT corroboravam os dados anteriormente obtidos. Contudo, em nosso sistema de estudo foi verificado que a associação entre os dois trabalhos esteve restrita à redução no conteúdo de lignina, não sendo observada alteração nas quantidades de celulose e hemicelulose, apesar dos perfis de expressão de alguns genes e reguladores transcricionais dessas vias (i.e. CESAs, CSLs e FTs MYB) apresentarem-se influenciados pela superexpressão de ShSHN1. Ademais, foi demonstrado que genes relacionados à biossíntese de cera e cutina também tiveram seus padrões induzidos pela superexpressão de ShSHN1, corroborando a maioria dos dados disponíveis na literatura que correlacionam a ação de SHN ao aumento destes componentes. Interessante, em relação ao conteúdo de pectinas - outro componente das paredes celulares - pode ser constatado um aumento significativo (Fig. 29.c) e que até então não havia sido associado à ação dos FTs SHN. Além disso, em contraste com os relatos anteriores, em que a expressão heteróloga de AtSHN2 não afetou significativamente as características de crescimento das linhagens transgênicas (Ambavaram et al., 2011), a superexpressão de ShSHN1 em arroz, bem como de PvERF001 em switchgrass, resultou em um aumento do crescimento das plantas, incluindo altura, número de perfilhos e biomassa total nas linhagens transgênicas.

As diferenças encontradas quanto ao conteúdo de celulose, hemicelulose e biomassa em plantas transgênicas AtSHN2, PvERF001 e ShSHN1, podem indicar diferenças de especialização funcionais entre estes genes. Divergências funcionais entre FTs homólogos relacionados à formação da parede celular em monocotiledôneas e dicotiledôneas já foram relatadas em trabalhos recentes. Estudos com o homólogo putativo do FT AtMYB58/63 em arroz (OsMYB58/63) mostraram que apesar deste gene estar correlacionado com a ativação de genes da biossíntese de lignina em Arabidopsis, em arroz este mecanismo não se repete. Ao contrário, sua atuação parece estar relacionada com a modulação de genes da via de celulose (Hirano et al., 2013). Estas divergências funcionais podem ser evidenciadas até mesmo entre espécies correlatas como milho, sorgo e arroz conforme descrito por Argawal et al. (2016), ao demonstrarem recentemente que os FTs MYB31 e MYB42 apresentam funções distintas na modulação da expressão de genes da via de lignina, tais como COMT1, 4CL2 e F5H, entre essas três espécies próximas. Por outro lado, um aspecto relevante que pode justificar as diferenças observadas são os tipos de abordagens utilizadas na caracterização funcional destes FTs. Cada estudo utilizou-se de um conjunto de procedimentos (metodologia) distintos, quer seja pela utilização de promotores diferentes (CaMV35S x UBi-1) ou estratégias de superexpressão distintas (expressão heteróloga x expressão homóloga), ou ainda pelo nível de expressão variável do transgene obtido entre as diferentes linhagens de estudo selecionadas, ou por meio da coleta e análise diferencial de dados dessas plantas (i.e. tipos/regiões de tecidos avaliados e/ou estágios diferentes de

desenvolvimento das plantas). Juntos, estes fatos podem afetar a forma como os resultados são gerados e descritos, justificando as diferenças observadas.

Com base em tudo o que foi discutido até aqui, é possível que o FT ShSHN1 desempenhe um papel central na modulação da expressão de genes que regulam o metabolismo de vias como a da lignina, pectina, além de cera e cutina, atuando como um regulador geral na modulação transcricional destas vias. Além disso, modulação negativa no padrão de expressão de genes da via de celulose e hemicelulose, embora não refletidos em alterações no conteúdo desses polissacarídeos nas linhagens ShSHN1, sugerem que o FT ShSHN1 possa atuar como regulador transcricional também dessas vias. É possível também que outros FTs, além dos avaliados por qPCR e que se mostraram responsivos à superexpressão de ShSHN1 (i.e. OsSND1, OsMYB56/63 e OsMYB20/43), possam estar envolvidos na mediação de SHN durante o desenvolvimento da parede celular. Porém, estudos adicionais ainda serão realizados e fornecerão as bases para o entendimento destas questões.

O mais interessante é que todos esses mecanismos de regulação da biossíntese da parede celular podem ter evoluído com a re-organização das células vegetais durante a colonização do ambiente terrestre, conferindo maior proteção, resistência e impermeabilidade aos tecidos vegetais. A coordenação destes processos provavelmente foi mantida por reguladores mestres da família SHN ao longo do curso evolutivo das plantas. Em conjunto, os FTs SHN parecem regular o acúmulo de celulose, lignina e pectinas (além de cera e cutina) na biomassa vegetal, e podem auxiliar o estudo e o aprimoramento de matérias primas para a produção de biocombustíveis. A caracterização funcional do FT ShSHN1 evidencia, portanto, o potencial de utilização deste gene no aprimoramento da biomassa em culturas energéticas como a cana-de-açúcar. A diminuição no conteúdo de lignina, aumento da biomassa, e maior eficiência no processo de sacarificação aqui obtidos, destacam seu grande apelo na pesquisa e desenvolvimento de combustíveis de origem renovável como o etanol 2G.

111

6 - Conclusões

No presente trabalho a sequencia referente ao FT ShSHN1 de cana-de-açúcar foi clonada, caracterizada e utilizada para a análise funcional em plantas transgênicas de arroz. Foi demonstrado que a superexpressão heteróloga de ShSHN1 conduz a alterações no padrão de expressão de genes relacionados à biossíntese da parede celular, tais como celulose, hemicelulose e lignina, além de cera e cutina. Desta forma, este trabalho acrescenta conhecimento para ajudar a desvendar a complexa rede que envolve os mecanismos regulatórios destas vias, além de auxiliar na compreensão dos padrões de desenvolvimento da parede celular e das células vegetais.

Outros resultados obtidos que são bastante relevantes, tanto para o entendimento funcional do gene, como para uma abordagem aplicada, foram que a expressão constitutiva de ShSHN1 em arroz promove: i-) o aumento significativo da biomassa vegetal; ii-) o incremento em até 200% no conteúdo de pectina; iii-) a redução no conteúdo total de lignina em até 50%, sem comprometer o desenvolvimento natural das plantas. Ademais, o acréscimo na síntese de polissacarídeos pécticos nas linhagens ShSHN1 pode agregar um valor energético adicional à biomassa vegetal.

O ganho de até 50% na eficiência do processo de sacarificação, juntamente com os demais resultados obtidos, evidencia o grande potencial do FT ShSHN1 para a manipulação de organismos geneticamente modificados visando o desenvolvimento de matérias primas aprimoradas, e que possam ser utilizadas na produção de biocombustíveis como o etanol 2G. Assim, este estudo abre novos horizontes para a pesquisa e engenharia genética de culturas energéticas como a cana-de-açúcar.

7 - Referências Bibliográficas

Agarwal, T., E. Grotewold, et al. (2016). "MYB31/MYB42 Syntelogs Exhibit Divergent Regulation of Phenylpropanoid Genes in Maize, Sorghum and Rice." Scientific Reports 6: 28502.

Aharoni, A., S. Dixit, et al. (2004). "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 16(9): 2463-2480.

Al-Abdallat, A., H. Al-Debei, et al. (2014). "Over-Expression of SISHN1 Gene Improves Drought Tolerance by Increasing Cuticular Wax Accumulation in Tomato." International Journal of Molecular Sciences 15(11): 19499.

Al-Abdallat, A. M., H. S. Al-Debei, et al. (2014). "Over-expression of SISHN1 gene improves drought tolerance by increasing cuticular wax accumulation in tomato." International journal of molecular sciences 15(11): 19499-19515.

Aljanabi, S. M., L. Forget, et al. (1999). "An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide- and Polyphenol-Free Sugarcane DNA." Plant Molecular Biology Reporter 17(3): 281-281.

Altpeter, F. and H. Oraby (2010). Sugarcane. Genetic Modification of Plants: Agriculture, Horticulture and Forestry. F. Kempken and C. Jung. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 453-472.

Alvira, P., E. Tomás-Pejó, et al. (2010). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." Bioresource Technology 101(13): 4851-4861.

Ambavaram, M. M. R., A. Krishnan, et al. (2011). "Coordinated Activation of Cellulose and Repression of Lignin Biosynthesis Pathways in Rice." Plant Physiology 155(2): 916-931.

Shimamoto and Kyozuka (2002). "RICE AS A MODEL FOR COMPARATIVE GENOMICS OF PLANTS." Annual Review of Plant Biology 53(1): 399-419.

Andrade, L. M. (2016). Caracterização dos Genes Dirigente-Jacalina e Deidrina de Cana de Açucar e seu Papel na Tolerância a Seca, por meio da Expressão Heteróloga em Arroz. Faculdade de Medicina de Ribeirçao Preto - Departamento de Genética. Não Publicado, Universidade de São Paulo. Doutorado.

Appenzeller, L., M. Doblin, et al. (2004). "Cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of the cellulose synthase (CesA) gene family." Cellulose 11(3): 287-299.

Arioli, T., L. Peng, et al. (1998). "Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in Arabidopsis." Science 279(5351): 717-720.

Barros, J., H. Serk, et al. (2015). "The cell biology of lignification in higher plants." Annals of Botany 115(7): 1053-1074.

Basnayake, S. W., R. Moyle, et al. (2011). "Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars." Plant cell reports 30(3): 439-448.

Bell-Lelong, D. A., J. C. Cusumano, et al. (1997). "Cinnamate-4-Hydroxylase Expression in Arabidopsis (Regulation in Response to Development and the Environment)." Plant Physiology 113(3): 729-738.

Bhatia, R. and M. Bosch (2014). "Transcriptional regulators of Arabidopsis secondary cell wall formation: tools to re-program and improve cell wall traits." Frontiers in Plant Science 5(192).

Bidlack, J. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.

Blee, K. A., E. R. Wheatley, et al. (2001). "Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters." Planta 212(3): 404-415.

Brett, C. T. and K. W. Waldron (1996). Physiology and biochemistry of plant cell walls, Springer Science & Business Media.

Brown, L. and R. Torget (1996). "Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass." Laboratory analytical procedure 9.

Buckeridge, M. S., H. Pessoa dos Santos, et al. (2000). "Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds." Plant Physiology and Biochemistry 38(1–2): 141-156.

Burton, R. A., N. Farrokhi, et al. (2005). "Plant cell wall polysaccharide biosynthesis: real progress in the identification of participating genes." Planta 221(3): 309-312.

Burton, R. A., S. M. Wilson, et al. (2006). "Cellulose Synthase-Like CsIF Genes Mediate the Synthesis of Cell Wall (1,3;1,4)-B-D-Glucans." Science 311(5769): 1940-1942.

Buxdorf, K., G. Rubinsky, et al. (2014). "The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants." Plant Molecular Biology 84(1): 37-47.

Carpita, N. C. (1996). "STRUCTURE AND BIOGENESIS OF THE CELL WALLS OF GRASSES." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47(1): 445-476.

Carpita, N. C. (2012). "Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: new ideas for improving biomass for bioenergy." Current Opinion in Biotechnology 23(3): 330-337.

Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth." The Plant Journal 3(1): 1-30.

Carroll, A. and C. Somerville (2009). "Cellulosic Biofuels." Annual Review of Plant Biology 60(1): 165-182.

Carvalho-Netto, O. V., J. A. Bressiani, et al. (2014). "The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry." Chemical and Biological Technologies in Agriculture 1(1): 20.

Chai, M., M. Bellizzi, et al. (2015). "The NAC transcription factor OsSWN1 regulates secondary cell wall development in Oryza sativa." Journal of Plant Biology 58(1): 44-51.

Chandel, A. K., S. S. da Silva, et al. (2012). "Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products." Journal of Chemical Technology & Biotechnology 87(1): 11-20.

Chawla, R., M. Ariza-Nieto, et al. (2006). "Transgene expression produced by biolistic-mediated, site-specific gene integration is consistently inherited by the subsequent generations." Plant biotechnology journal 4(2): 209-218.

Cheavegatti-Gianotto, A., H. M. de Abreu, et al. (2011). "Sugarcane (Saccharum X officinarum): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil." Trop Plant Biol 4(1): 62-89.

Chen, F. and R. A. Dixon (2007). "Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production." Nat Biotechnol 25(7): 759-761.

Chen, L., C. Auh, et al. (2002). "Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages." Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(20): 5558-5565.

Chundawat, S. P., B. S. Donohoe, et al. (2011). "Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment." Energy & Environmental Science 4(3): 973-984.

Cosgrove, D. J. (2005). "Growth of the plant cell wall." Nat Rev Mol Cell Biol 6(11): 850-861.

D'Hont, A., F. Paulet, et al. (2002). "Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes." Chromosome Research 10(3): 253-262.

Dey, P. M. and K. Brinson (1984). Plant Cell-Walls. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. R. S. Tipson and H. Derek, Academic Press. Volume 42: 265-382.

Dubois, M., K. A. Gilles, et al. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Analytical chemistry 28(3): 350-356.

Dweikat, I., C. Weil, et al. (2012). "Envisioning the transition to a next-generation biofuels industry in the US Midwest." Biofuels, Bioproducts and Biorefining 6(4): 376-386.

Dwivany, F. M., D. Yulia, et al. (2009). "The CELLULOSE-SYNTHASE LIKE C (CSLC) Family of Barley Includes Members that Are Integral Membrane Proteins Targeted to the Plasma Membrane." Molecular Plant 2(5): 1025-1039.

Edwards, M. C. and J. Doran-Peterson (2012). "Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production." Applied Microbiology and Biotechnology 95(3): 565-575.

Elkind, Y., R. Edwards, et al. (1990). "Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene." Proceedings of the National Academy of Sciences 87(22): 9057-9061.

Enríquez-Obregón, G. A., R. I. Vázquez-Padrón, et al. (1998). "Herbicide-resistant sugarcane (Saccharum officinarum L.) plants by Agrobacterium-mediated transformation." Planta 206(1): 20-27.

Fan, L., R. Linker, et al. (2006). "Progressive Inhibition by Water Deficit of Cell Wall Extensibility and Growth along the Elongation Zone of Maize Roots Is Related to Increased Lignin Metabolism and Progressive Stelar Accumulation of Wall Phenolics." Plant Physiology 140(2): 603-612.

Field, C. B., M. J. Behrenfeld, et al. (1998). "Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components." Science 281(5374): 237-240.

Fonseca, B. G., R. d. O. Moutta, et al. (2011). "Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using Issatchenkia occidentalis CCTCC M 206097 yeast." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 38(1): 199-207.

Franke, R., M. R. Hemm, et al. (2002). "Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis." The Plant Journal 30(1): 47-59.

Franke, R., C. M. McMichael, et al. (2000). "Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase." The Plant Journal 22(3): 223-234.

Fry, S. C., S. C. Willis, et al. (2000). "Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures." Planta 211(5): 679-692.

Fu, C., X. Xiao, et al. (2011). "Downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) leads to improved saccharification efficiency in switchgrass." BioEnergy Research 4(3): 153-164.

Furtado, A., J. S. Lupoi, et al. (2014). "Modifying plants for biofuel and biomaterial production." Plant biotechnology journal 12(9): 1246-1258.

Gallego-Giraldo, L., L. Escamilla-Trevino, et al. (2011). "Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants." Proceedings of the National Academy of Sciences 108(51): 20814-20819.

Gallo-Meagher, M., R. G. English, et al. (2000). "Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 36(1): 37-40.

Gao, S.-J., M. B. Damaj, et al. (2013). "Enhanced transgene expression in sugarcane by coexpression of virus-encoded RNA silencing suppressors." PloS one 8(6): e66046.

García, J. R., N. Anderson, et al. (2014). "Rescue of syringyl lignin and sinapate ester biosynthesis in Arabidopsis thaliana by a coniferaldehyde 5-hydroxylase from Eucalyptus globulus." Plant Cell Reports 33(8): 1263-1274.

Gírio, F. M., C. Fonseca, et al. (2010). "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review." Bioresource Technology 101(13): 4775-4800.

Goujon, T., R. Sibout, et al. (2003). "Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in Arabidopsis thaliana." Plant Physiology and Biochemistry 41(8): 677-687.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series.

Hamada, K., K. Hongo, et al. (2011). "OryzaExpress: An Integrated Database of Gene Expression Networks and Omics Annotations in Rice." Plant and Cell Physiology 52(2): 220-229.

Hatfield, R. and R. S. Fukushima (2005). "Can lignin be accurately measured?" Crop science 45(3): 832-839.

Hattori, Y., K. Nagai, et al. (2009). "The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water." Nature 460(7258): 1026-1030.

Hayashi, T. and R. Kaida (2011). "Functions of Xyloglucan in Plant Cells." Molecular Plant 4(1): 17-24.

Hayashi, T., R. Kaida, et al. (2010). "Loosening xyloglucan prevents tensile stress in tree stem bending but accelerates the enzymatic degradation of cellulose." Russian Journal of Plant Physiology 57(3): 316-320.

Hirano, K., M. Kondo, et al. (2013). "Identification of Transcription Factors Involved in Rice Secondary Cell Wall Formation." Plant and Cell Physiology 54(11): 1791-1802.

Hoch, G. (2007). "Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues." Functional Ecology 21(5): 823-834.

Hsieh, Y. S. Y. and C.-Y. Wong (2010). "THE COMPOSITION OF POLYSACCHARIDES IN PRIMARY WALLS OF LITCHI CHINENSIS SONN." Journal of Food Biochemistry 34(5): 971-982.

Hu, W.-J., S. A. Harding, et al. (1999). "Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees." Nature biotechnology 17(8): 808-812.

Jain, M., A. Nijhawan, et al. (2006). "Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR." Biochemical and Biophysical Research Communications 345(2): 646-651.

Jarvis, M. C., S. P. H. Briggs, et al. (2003). "Intercellular adhesion and cell separation in plants." Plant, Cell & Environment 26(7): 977-989.

Johansen, D. A. (1940). Plant Microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Company: 53-60.

Jones, L., A. R. Ennos, et al. (2001). "Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin deficient mutant of Arabidopsis." The Plant Journal 26(2): 205-216.

Jung, J., S. Y. Won, et al. (2007). "The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in Arabidopsis." Planta 225(3): 575-588.

Jung, J. H., W. M. Fouad, et al. (2012). "RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass." Plant Biotechnology Journal 10(9): 1067-1076.

Jung, J. H., B. Kannan, et al. (2016). "Precision breeding for RNAi suppression of a major 4coumarate: coenzyme A ligase gene improves cell wall saccharification from field grown sugarcane." Plant Molecular Biology: 1-13.

Jung, J. H., W. Vermerris, et al. (2013). "RNA interference suppression of lignin biosynthesis increases fermentable sugar yields for biofuel production from field-grown sugarcane." Plant Biotechnology Journal 11(6): 709-716.

Kannangara, R., C. Branigan, et al. (2007). "The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in Arabidopsis thaliana." The Plant Cell 19(4): 1278-1294.

Karlsson, M., M. Melzer, et al. (2005). "Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in Zinnia elegans." Journal of Experimental Botany 56(418): 2085-2093.

Kikuchi, S., K. Satoh, et al. (2003). "Collection, Mapping, and Annotation of Over 28,000 cDNA Clones from japonica Rice." Science 301(5631): 376-379.

Kishimoto, T., W. Chiba, et al. (2010). "Influence of Syringyl to Guaiacyl Ratio on the Structure of Natural and Synthetic Lignins." Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(2): 895-901.

Krishnan, A., E. Guiderdoni, et al. (2009). "Mutant Resources in Rice for Functional Genomics of the Grasses." Plant Physiology 149(1): 165-170.

Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics 23(21): 2947-2948.

Lashbrooke, J., A. Aharoni, et al. (2015). "Genome investigation suggests MdSHN3, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development." Journal of Experimental Botany.

Latchman, D. and D. S. Latchman (2010). Eukaryotic transcription factors, Academic press.

Li, X., J.-K. Weng, et al. (2008). "Improvement of biomass through lignin modification." The Plant Journal 54(4): 569-581.

Liepman, A. H., R. Wightman, et al. (2010). "Arabidopsis – a powerful model system for plant cell wall research." The Plant Journal 61(6): 1107-1121.

Liepman, A. H., C. G. Wilkerson, et al. (2005). "Expression of cellulose synthase-like (Csl) genes in insect cells reveals that CslA family members encode mannan synthases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(6): 2221-2226.

Lin, F., G. Yamano, et al. (2006). "Cloning and functional analysis of caffeic acid 3-O-methyltransferase from rice (Oryza sativa)." Journal of Pesticide Science 31(1): 47-53.

Lionetti, V., F. Francocci, et al. (2010). "Engineering the cell wall by reducing de-methylesterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(2): 616-621.

Liu, Q., L. Zheng, et al. (2015). "Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots." Plant and Soil 387(1-2): 323-336.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT Method." Methods 25(4): 402-408.

Llerena, J. P. P. (2016). Lignina em espécies de Saccharum spp. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Mestre: 100.

Lu, C., D.-H. Jeong, et al. (2008). "Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs)." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(12): 4951-4956.

Lu, X., W. Jiang, et al. (2012). "Characterization of a novel ERF transcription factor in Artemisia annua and its induction kinetics after hormones and stress treatments." Molecular biology reports 39(10): 9521-9527.

Manners, J. M. and R. E. Casu (2011). "Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane." Tropical Plant Biology 4(1): 9-21.

Mason, G., P. Provero, et al. (2002). "Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR." BMC Biotechnology 2(1): 20.

Matsuoka, S., J. Ferro, et al. (2009). "The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 45(3): 372-381.

McCarthy, R. L., R. Zhong, et al. (2009). "MYB83 Is a Direct Target of SND1 and Acts Redundantly with MYB46 in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis." Plant and Cell Physiology 50(11): 1950-1964.

McFarlane, H. E., A. Döring, et al. (2014). "The Cell Biology of Cellulose Synthesis." Annual Review of Plant Biology 65(1): 69-94.

McNamara, J. T., J. L. W. Morgan, et al. (2015). "A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis." Annual review of biochemistry 84: 895-921.

Ming, R., P. H. Moore, et al. (2010). Sugarcane Improvement through Breeding and Biotechnology. Plant Breeding Reviews, John Wiley & Sons, Inc.: 15-118.

Mitsuda, N., A. Iwase, et al. (2007). Functional analysis of NST transcription factors regulating secondary wall synthesis. PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND.

Mitsuda, N., M. Seki, et al. (2005). "The NAC Transcription Factors NST1 and NST2 of Arabidopsis Regulate Secondary Wall Thickenings and Are Required for Anther Dehiscence." The Plant Cell 17(11): 2993-3006.

Mohnen, D. (2008). "Pectin structure and biosynthesis." Current Opinion in Plant Biology 11(3): 266-277.

Moura, J. C. M. S., C. A. V. Bonine, et al. (2010). "Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants." Journal of Integrative Plant Biology 52(4): 360-376.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

Nakamura, H., M. Hakata, et al. (2007). "A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system." Plant Molecular Biology 65(4): 357-371.

Nakano, Y., N. Nishikubo, et al. (2010). "MYB transcription factors orchestrating the developmental program of xylem vessels in Arabidopsis roots." Plant Biotechnology 27(3): 267-272.

Nakashima, H., N. Hashimoto, et al. (2012). "Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells." Molecular Carcinogenesis 51(5): 400-410.

Neelakandan, A. K. and K. Wang (2012). "Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications." Plant cell reports 31(4): 597-620.

Neutelings, G. (2011). "Lignin variability in plant cell walls: Contribution of new models." Plant Science 181(4): 379-386.

Noda, S., T. Koshiba, et al. (2015). "The expression of a rice secondary wall-specific cellulose synthase gene, OsCesA7, is directly regulated by a rice transcription factor, OsMYB58/63." Planta 242(3): 589-600.

Nuruzzaman, M., A. M. Sharoni, et al. (2013). "Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants." Frontiers in Microbiology 4(248).

Ohashi-Ito, K., Y. Oda, et al. (2010). "Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 Directly Regulates the Genes That Govern Programmed Cell Death and Secondary Wall Formation during Xylem Differentiation." The Plant Cell 22(10): 3461-3473.

Ohman, D., B. Demedts, et al. (2012). "MYB103 is required for FERULATE-5-HYDROXYLASE expression and syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis stems." Plant J.

Ohnishi, T., H. Takanashi, et al. (2011). "Distinct Gene Expression Profiles in Egg and Synergid Cells of Rice as Revealed by Cell Type-Specific Microarrays." Plant Physiology 155(2): 881-891.

Ohnishi, T., M. Yoshino, et al. (2011). "The Biotron Breeding System: A Rapid and Reliable Procedure for Genetic Studies and Breeding in Rice." Plant and Cell Physiology 52(7): 1249-1257.

Pauly, M., S. Gille, et al. (2013). "Hemicellulose biosynthesis." Planta 238(4): 627-642.

Pauly, M. and K. Keegstra (2008). "Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels." The Plant Journal 54(4): 559-568.

Pauly, M. and K. Keegstra (2010). "Plant cell wall polymers as precursors for biofuels." Current Opinion in Plant Biology 13(3): 304-311.

Peixoto, R. F. (2016). Identificação e Caracterização de Fatores de Transcrição envolvidos na Resposta ao Estresse por Seca em Cana-de-Açucar e Análise Funcional em Arroz Transgênico. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Departamento de Genética. Não Publicado, Universidade de São Paulo. Doutorado.

Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Research 30(9): e36.

Phitsuwan, P. and K. Ratanakhanokchai (2014). "Can we create "Elite Rice"—a multifunctional crop for food, feed, and bioenergy production?" Sustainable Chemical Processes 2(1): 10.

Phitsuwan, P., K. Sakka, et al. (2013). "Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability." Biomass and bioenergy 58: 390-405.

Pierik, R. L. M. (1997). In vitro culture of higher plants, Springer Science & Business Media.

Plomion, C., G. Leprovost, et al. (2001). "Wood formation in trees." Plant physiology 127(4): 1513-1523.

Pomar, F., N. Caballero, et al. (2002). "H2O2 generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis." FEBS Letters 529(2–3): 198-202.

Poorter, H. and R. Villar (1997). "The fate of acquired carbon in plants: chemical composition and construction costs."

Popper, Z. A. and S. C. Fry (2008). "Xyloglucan-pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall." Planta 227(4): 781-794.

Pu, Y., F. Chen, et al. (2009). "NMR Characterization of C3H and HCT Down-Regulated Alfalfa Lignin." BioEnergy Research 2(4): 198.

Ralph, J., K. Lundquist, et al. (2004). "Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids." Phytochemistry Reviews 3(1): 29-60.

Ramakers, C., J. M. Ruijter, et al. (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." Neuroscience Letters 339(1): 62-66.

Reis, R. R., B. A. D. B. da Cunha, et al. (2014). "Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane." Plant science 221: 59-68.

Ridley, B. L., M. A. O'Neill, et al. (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." Phytochemistry 57(6): 929-967.

Roach, B. (1995). Case for a core collection of sugarcane germplasm. Proceedings XXI Congress of ISSCT, Bangkok (Thailand), 5-14 Mar 1992.

Rogers, L. A. and M. M. Campbell (2004). "The genetic control of lignin deposition during plant growth and development." New Phytologist 164(1): 17-30.

Rose, D. J., J. A. Patterson, et al. (2009). "Structural differences among alkali-soluble arabinoxylans from maize (Zea mays), rice (Oryza sativa), and wheat (Triticum aestivum) brans influence human fecal fermentation profiles." Journal of agricultural and food chemistry 58(1): 493-499.

Rubin, E. M. (2008). "Genomics of cellulosic biofuels." Nature 454(7206): 841-845.

Rushton, P. J., M. T. Bokowiec, et al. (2008). "Tobacco Transcription Factors: Novel Insights into Transcriptional Regulation in the Solanaceae." Plant Physiology 147(1): 280-295.

Saha, S. and S. Ramachandran (2013). "Genetic improvement of plants for enhanced bioethanol production." Recent patents on DNA & gene sequences 7(1): 36-44.

Saika, H. and S. Toki (2009). "Visual selection allows immediate identification of transgenic rice calli efficiently accumulating transgene products." Plant cell reports 28(4): 619-626.

Sakurai, T., Y. Kondou, et al. (2011). "RiceFOX: A Database of Arabidopsis Mutant Lines Overexpressing Rice Full-Length cDNA that Contains a Wide Range of Trait Information to Facilitate Analysis of Gene Function." Plant and Cell Physiology 52(2): 265-273.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, L. V., M. C. de Barros Grassi, et al. (2016). "Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality." Industrial Biotechnology 12(1): 40-57.

Santos Brito, M., P. M. Nobile, et al. (2015). "Expression Profile of Sugarcane Transcription Factor Genes Involved in Lignin Biosynthesis." Tropical Plant Biology 8(1): 19-30.

Sarangi, B. K., A. Pulavarty, et al. (2015). "Assessment of Agrobacterium Transformation Efficiency in a Model plant System." Journal of Plant Biology Research 3(2).

Sarasan, V., R. Cripps, et al. (2006). "Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 42(3): 206-214.

Scheller, H. V., J. K. Jensen, et al. (2007). "Biosynthesis of pectin." Physiologia Plantarum 129(2): 283-295.

Scheller, H. V. and P. Ulvskov (2010). "Hemicelluloses." Annual Review of Plant Biology 61(1): 263-289.

Schilmiller, A. L., J. Stout, et al. (2009). "Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis." The Plant Journal 60(5): 771-782.

Schubert, C. (2006). "Can biofuels finally take center stage?" Nat Biotech 24(7): 777-784.

Schubert, D., B. Lechtenberg, et al. (2004). "Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects." The Plant Cell 16(10): 2561-2572.

Shen, H., X. Z. He, et al. (2012). "Functional characterization of the switchgrass (Panicum virgatum) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks." New Phytologist 193(1): 121-136.

Shi, J. X., A. Adato, et al. (2013). "The tomato SISHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning." New Phytologist 197(2): 468-480.

Shi, J. X., S. Malitsky, et al. (2011). "SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs." PLoS Genet 7(5): e1001388.

Singh, K. B., R. C. Foley, et al. (2002). "Transcription factors in plant defense and stress responses." Current Opinion in Plant Biology 5(5): 430-436.

Somerville, C. (2006). "Cellulose Synthesis in Higher Plants." Annual Review of Cell and Developmental Biology 22(1): 53-78.

Somerville, C., S. Bauer, et al. (2004). "Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls." Science 306(5705): 2206-2211.

Somerville, C., H. Youngs, et al. (2010). "Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels." Science 329(5993): 790-792.

Song, J. and Z. Wang (2009). "Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from Salvia miltiorrhiza." Molecular biology reports 36(5): 939-952.

Sood, P., A. Bhattacharya, et al. (2011). "Problems and possibilities of monocot transformation." Biologia Plantarum 55(1): 1-15.

Sparkes, I., N. Tolley, et al. (2010). "Five Arabidopsis reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties." The Plant Cell 22(4): 1333-1343.

Sparkes, I. A., J. Runions, et al. (2006). "Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants." Nat. Protocols 1(4): 2019-2025.

Srivastava, A. C., K. Palanichelvam, et al. (2010). "Collection and Analysis of Expressed Sequence Tags Derived from Laser Capture Microdissected Switchgrass (Panicum virgatum L. Alamo) Vascular Tissues." BioEnergy Research 3(3): 278-294.

Taketa, S., S. Amano, et al. (2008). "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 105(10): 4062-4067.

Tamura, K., J. Dudley, et al. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0." Molecular Biology and Evolution 24(8): 1596-1599.

Tanaka, K., K. Murata, et al. (2003). "Three Distinct Rice Cellulose Synthase Catalytic Subunit Genes Required for Cellulose Synthesis in the Secondary Wall." Plant Physiology 133(1): 73-83.

Taparia, Y., W. M. Fouad, et al. (2012). "Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 48(1): 15-22.

Taylor-Teeples, M., L. Lin, et al. (2015). "An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis." Nature 517(7536): 571-575.

Tijmensen, M. J. A., A. P. C. Faaij, et al. (2002). "Exploration of the possibilities for production of Fischer Tropsch liquids and power via biomass gasification." Biomass and Bioenergy 23(2): 129-152.

Toki, S., N. Hara, et al. (2006). "Early infection of scutellum tissue with Agrobacterium allows high-speed transformation of rice." The Plant Journal 47(6): 969-976.

Tran, L.-S. P., K. Nakashima, et al. (2007). "Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis." The Plant Journal 49(1): 46-63.

Trijatmiko, K. R., G. van Arkel, et al. (2005). "Expression of the Arabidopsis SHINE gene in rice for drought resistance." COMPARATIVE ANALYSIS OF DROUGHT RESISTANCE GENES IN ARABIDOPSIS AND RICE: 67.

Tyagi, A. P. and P. Lal (2008). "Correlation and path coefficient analysis in sugarcane." The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences 25(1): 1-9.

Vega-Sánchez, M. E. and P. C. Ronald (2010). "Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement." Current Opinion in Biotechnology 21(2): 218-224.

Vergunst, A. C. and P. J. Hooykaas (1999). "Recombination in the plant genome and its application in biotechnology." Critical reviews in plant sciences 18(1): 1-31.

Vettore, A. L., F. R. d. Silva, et al. (2001). "The libraries that made SUCEST." Genetics and Molecular Biology 24(1-4): 1-7.

Vicentini, R., A. Bottcher, et al. (2015). "Large-Scale Transcriptome Analysis of Two Sugarcane Genotypes Contrasting for Lignin Content." PLoS ONE 10(8): e0134909.

Voelker, S. L., B. Lachenbruch, et al. (2011). "Reduced wood stiffness and strength, and altered stem form, in young antisense 4CL transgenic poplars with reduced lignin contents." New Phytologist 189(4): 1096-1109.

Wang, H.-Z. and R. A. Dixon (2012). "On–Off Switches for Secondary Cell Wall Biosynthesis." Molecular Plant 5(2): 297-303.

Wang, K., L. Ou, et al. (2015). "Beyond ethanol: a techno-economic analysis of an integrated corn biorefinery for the production of hydrocarbon fuels and chemicals." Biofuels, Bioproducts and Biorefining 9(2): 190-200.

Wang, L., Z. Feng, et al. (2010). "DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data." Bioinformatics 26(1): 136-138.

Wang, L., K. Guo, et al. (2010). "Expression profiling and integrative analysis of the CESA/CSL superfamily in rice." BMC plant biology 10(1): 1.

Wang, P., N. Dudareva, et al. (2015). "Genetic manipulation of lignocellulosic biomass for bioenergy." Current opinion in chemical biology 29: 32-39.

Wang, Y., L. Wan, et al. (2012). "An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice." Plant Molecular Biology 78(3): 275-288.

Weng, J.-K., X. Li, et al. (2008). "Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production." Current opinion in biotechnology 19(2): 166-172.

Weng, J. K., X. Li, et al. (2008). "Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production." Curr Opin Biotechnol 19(2): 166-172.

Willats, W. G. T., L. McCartney, et al. (2001). "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis." Plant Molecular Biology 47(1): 9-27.

Wu, Z., S. Gui, et al. (2014). "Molecular evolution and functional characterisation of an ancient phenylalanine ammonia-lyase gene (NnPAL1) from Nelumbo nucifera: novel insight into the evolution of the PAL family in angiosperms." BMC Evolutionary Biology 14(1): 100.

Wuddineh, W. A., M. Mazarei, et al. (2015). "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 3(101).

Xiao, C. and C. Anderson (2013). "Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels." Frontiers in Plant Science 4(67).

Xie, Z., E. Allen, et al. (2005). "Expression of Arabidopsis MIRNA Genes." Plant Physiology 138(4): 2145-2154.

Xu, Y., H. Wu, et al. (2016). "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 17(4): 587.

Xu, Z., D. Zhang, et al. (2009). "Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom." BMC Bioinformatics 10(11): S3.

Yamaguchi, M., N. Mitsuda, et al. (2011). "VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation." The Plant Journal 66(4): 579-590.

Yamaguchi, M., M. Ohtani, et al. (2010). "VND-INTERACTING2, a NAC Domain Transcription Factor, Negatively Regulates Xylem Vessel Formation in Arabidopsis." The Plant Cell 22(4): 1249-1263.

Yan, L., C. Xu, et al. (2013). "The heterologous expression in Arabidopsis thaliana of sorghum transcription factor SbbHLH1 downregulates lignin synthesis." Journal of Experimental Botany 64(10): 3021-3032.

Yang, D. H., B. Y. Chung, et al. (2005). "cDNA cloning and sequence analysis of the rice cinnamate-4-hydroxylase gene, a cytochrome P450-dependent monooxygenase involved in the general phenylpropanoid pathway." Journal of Plant Biology 48(3): 311-318.

Yang, F., P. Mitra, et al. (2013). "Engineering secondary cell wall deposition in plants." Plant Biotechnology Journal 11(3): 325-335.

Yang, J., M. I. Ordiz, et al. (2011). "Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata." Plant Physiology and Biochemistry 49(12): 1448-1455.

Yang, J. H. and H. Wang (2016). "Molecular Mechanisms for Vascular Development and Secondary Cell Wall Formation." Frontiers in Plant Science 7(356).

Yaseen, M., T. Ahmad, et al. (2013). "Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development." Molecular biology reports 40(4): 2837-2849.

Yee, K. L., M. Rodriguez Jr, et al. (2012). "Evaluation of the bioconversion of genetically modified switchgrass using simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing approach." Biotechnology for Biofuels 5(1): 81.

Yin, Y., J. Huang, et al. (2009). "The cellulose synthase superfamily in fully sequenced plants and algae." BMC Plant Biology 9(1): 99.

Yoon, J., H. Choi, et al. (2015). "Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development." Journal of Integrative Plant Biology 57(11): 902-912.

Yu, X., J. Lin, et al. (2006). "Computational analysis of tissue-specific combinatorial gene regulation: predicting interaction between transcription factors in human tissues." Nucleic acids research 34(17): 4925-4936.

Yuan, J. S., K. H. Tiller, et al. (2008). "Plants to power: bioenergy to fuel the future." Trends in Plant Science 13(8): 421-429.

Zhang, G., Y. Zhang, et al. (2014). "The CCoAOMT1 gene from jute (Corchorus capsularis L.) is involved in lignin biosynthesis in Arabidopsis thaliana." Gene 546(2): 398-402.

Zhang, J.-Y., C. D. Broeckling, et al. (2007). "Heterologous expression of two Medicago truncatula putative ERF transcription factor genes, WXP1 and WXP2, in Arabidopsis led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance." Plant molecular biology 64(3): 265-278.

Zhang, Z., W. Yao, et al. (2007). "A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments." Journal of Experimental Botany 58(11): 2993-3003.

Zhao, Q., L. Gallego-Giraldo, et al. (2010). "An NAC transcription factor orchestrates multiple features of cell wall development in Medicago truncatula." The Plant Journal 63(1): 100-114.

Zhong, H., Q.-Q. Guo, et al. (2012). "Two Brassica napus genes encoding NAC transcription factors are involved in response to high-salinity stress." Plant Cell Reports 31(11): 1991-2003.

Zhong, R., C. Lee, et al. (2011). "Transcriptional Activation of Secondary Wall Biosynthesis by Rice and Maize NAC and MYB Transcription Factors." Plant and Cell Physiology 52(10): 1856-1871.

Zhong, R., C. Lee, et al. (2008). "A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis." The Plant Cell 20(10): 2763-2782.

Zhong, R. and Z.-H. Ye (2007). "Regulation of cell wall biosynthesis." Current Opinion in Plant Biology 10(6): 564-572.

Zhong, R., Y. Yuan, et al. (2015). "Functional Characterization of NAC and MYB Transcription Factors Involved in Regulation of Biomass Production in Switchgrass Panicum virgatum." PLoS ONE 10(8): e0134611.

Zhou, J., C. Lee, et al. (2009). "MYB58 and MYB63 Are Transcriptional Activators of the Lignin Biosynthetic Pathway during Secondary Cell Wall Formation in Arabidopsis." The Plant Cell 21(1): 248-266.

Zhou, J., R. Zhong, et al. (2014). "Arabidopsis NAC Domain Proteins, VND1 to VND5, Are Transcriptional Regulators of Secondary Wall Biosynthesis in Vessels." PLoS ONE 9(8): e105726.

8 - Anexos

=

8 - Anexos

8.1 - Meios de Cultura

Meios de Cultura

- Meio **N6D** - pH 5,8

Sais N6	4 g				
Vitamina 1 (20x)	1mL				
Sacarose	30 g				
Prolina	2,88 g				
Amicase	0,3 g				
Gelrite	4 g				
2,4 D (10 mg/mL)	200 µl				
Volume Final	1000 mL				

- Meio **AAM** - pH 5,2

Sol. Macronutrientes2 (10x)	100 mL
Sol. Micronutrientes 2 (100x)	10 mL
Glicina	7,5 mg
Arginina	177 mg
Glutamina	900 mg
Ácido Aspártico	300 mg
Mio-Inositol	100 mg
Tiamina	10 mg
Ácido Nicotínico	1mL
Piridoxina	1mL
Sacarose	68,5 g
Glucose	36 g

Amicase	0,5 g				
Volume Final	1000 mL				

- Meio **2N6AS** - pH 5,2

Sais N6	4 g			
Vitamina 1 (20x)	1mL			
Sacarose	30 g			
Amicase	0,3 g			
Glucose	10 g			
Gelrite	4 g			
2,4 D (10 mg/mL)	200 µl			
Volume Final	1000 mL			

- Meio **RE-III** - pH 5,8

Sol. Macronutrientes3 (10x)	100 mL					
Sol. Micronutrientes 3 (100x)	10 mL					
Vitamina 3 (50x)	2mL					
Sacarose	30 g					
Amicase	2 g					
Sorbitol	30 g					
Cinetina (20mg/mL)	100 ul					
ANA (0,2mg/mL)	100 µl					
Volume Final	1000 mL					

- Meio **MS3 -** pH 5,8

Sol. Macronutrientes (50x)	20ml
Sol. Micronutrientes (100x)	10ml
Sacarose	25g
Solução Ca ⁺⁺ (66x)	15ml

Fe EDTA (100x)	10ml
2,4 D (10mg/ml)	300µl
Volume Final	1000 mL

8.2 - Preparo de Células Eletrocompetentes de E. coli (cepa DH10B) para Transformação

Uma colônia isolada da bactéria Escherichia coli (cepa DH10B) foi inoculada inicialmente em 2mL de meio LB líquido e incubada a 37 °C, durante a noite, sob agitação constante de 120 rpm. A cultura foi então re-inoculada em 200 mL de meio LB e crescida em shaker a 37 °C, por 3 horas, a 250 rpm (Shaker TE421– TECNAL). Logo após, a cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos e centrifugada a 4000 rpm / 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido gentilmente em 25 mL de água Milli-Q autoclavada gelada. Este procedimento foi repetido por três vezes seguidas, sendo que na última, o precipitado foi ressuspenso em 5mL de glicerol 10% gelado. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células novamente ressuspensas em um volume final de 500 µl de glicerol 10%, gelado. Esta suspensão de células foi aliquotada no gelo (40 µl para cada tubo tipo Eppendorf), e estocada em ultrafreezer – 80 °C, para posterior utilização.

8.3 - Transformação de Células Eletrocompetentes de E. coli (cepa DH10B) por Eletroporação

Em um tubo de 1,5 mL, contendo 40 µL de células eletrocompetentes, foi adicionado 1µl (~500 ng) do DNA plasmidial de interesse (pGEM ou pDONR 221 recombinado). Após ligeira homogeneização, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporador (0,1 cm²), previamente resfriada em gelo. A cubeta foi então colocada em um eletroporador Gene Pulse (BioRad) e um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV foi aplicado. Imediatamente após, 750 µl de meio LB líquido foram adicionados às células, que foram transferidas para um tubo de ensaio, e incubadas a 37 °C, com agitação de 250 rpm, por 1 hora. Posteriormente, 200 µl dessa cultura foram plaqueados em meio LB sólido

contendo 50 µg/mL de canamicina, e deixados "overnight" à 37 °C, em estufa bacteriológica.

8.4 - Preparo de Células Eletrocompetentes de Agrobacterium tumefaciens (cepa EHA-105)

Inicialmente, uma colônia isolada da cepa EHA-105 desarmada de *Agrobacterium tumefaciens*foi obtida de uma placa de Petri estriada contendo meio LB e o antibiótico rifampicina (50 µg/mL). A colônia foi então inoculada em 10 mL de meio LB líquido, e incubada por 2 dias, a 28 °C, sob agitação constante de 120 rpm. Em seguida, metade da cultura foi transferida para novos 200 mL de meio líquido LB, e crescida por cerca de 10 horas, também a 28°C. Esta cultura foi posteriormente centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm, e o precipitado foi ressuspenso em 200 mL de água estéril gelada. Esta lavagem foi repetida por mais duas vezes e, em seguida, as células foram ressuspensas em 10 mL de glicerol 10%. Após centrifugação a 12.000 rpm / 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi finalmente ressuspenso em 0,5 mL de glicerol 10%. Alíquotas de 40 µl foram alocadas em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL e estocadas a – 80 °C.

8.5 - Transformação de Células Competentes de Agrobacterium tumefaciens por Eletroporação

Em um tubo de 1,5 mL contendo 40 µL de células eletrocompetentes, foram delicadamente adicionados 1µl (~500 ng) do DNA referente ao vetor pOEshshn1, previamente replicados e purificados de *E. coli*. Após ligeira homogeneização, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporador (0,1 cm²), previamente resfriada em gelo. A cubeta foi então colocada em um eletroporador Gene Pulse (BioRad) e um pulso de corrente elétrica de 1,5 kV foi aplicada. Imediatamente após, 750 µl de meio LB líquido foram adicionados à cubeta e transferidos para um tubo de ensaio, onde foram incubadas por 4 horas, a 28 °C, e agitação de 120 rpm. Posteriormente, 300 µl da cultura foram plaqueados em meio LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de rifampicina,incubados "overnight", à 28 °C, sob agitação de 120 rpm.

8.6 - Alinhamentos

CLUSTAL O(1.2.2) -- Alinhamento Clones ShSHN1 - Variante A - 636 pb

SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG ATGACAGAGAATCTCCACTCCA
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGGTC *********************************
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG *****************************
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG *****************
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGATGCTCGCGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGATGCTCGCGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGATGCTCGCGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCGAGGAGCC TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCC TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCC *******************
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	CATGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT CATGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT CATGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT ***********************************
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	GTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAGCTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	GAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCAGC
SHSHN1.A.1-636pb SHSHN1.A.2-636pb SHSHN1.A.3-636pb	TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA ******************************

Sequência de Aminoácidos - 5'3' Frame 1

MTENLHSRKMVQPKKFRGVRQRHWGSWVSEIRHPLLKRRVWLGTFETAEEAARAYDEAAV LMSGRNAKTNFPVQRSSTGEPTPAAGRDARAGSGSSTANLSQILSAKLRKCCKAPSPSLT CLRLDPEKSHIGVWQKRAGAHADSNWVMTVELNKGATSTDVASQSTSATAAPPATPMDDE ERIALQMIEELLSSSSPASPSHGDDQGRFII

CLUSTAL O(1.2.2) -- Alinhamento Clones ShSHN1 - Variante B - 642 pb

SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG ATGACAGAGAATCTCCACTCCA
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCCTTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGGCC **************************
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG *****************************
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAACGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG *****************
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCAGCAACACTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCAGCAACACTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCAGGAAGGGACGCTCGCAGCAACGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCAGGAAGGGACGCTCGCAGCAACGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCAGGAAGGGACGCTCGCAGCAACGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC *********************************
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	CTGACCTGTCCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	ACTGATGCTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGCTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGCTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGCTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGCTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ********************************
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	GACGAGGAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCAGCCCAGCT GACGAGGAGAGAGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCAGCCCAGCT GACGAGGAGAGGA
SHSHN1.B.1-642pb SHSHN1.B.4-642pb SHSHN1.B.2-642pb SHSHN1.B.5-642pb SHSHN1.B.3-642pb	TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA

Sequência de Aminoácidos - 5'3' Frame 1

MTENLHSRKMVQPKKFRGVRQRHWGSWVSEIRHPLLKRRVWLGTFETAEEAARAYDEAAV LMSGRNAKTNFPVQRSSTGEPTPAAGRDARSNTGSGSSTANLSQILSAKLRKCCKAPSPS LTCLRLDPEKSHIGVWQKRAGARADSNWVMTVELNKGATSTDAASQSTSATTAPPATPMD DEERIALQMIEELLSSSSPASPSHGDDQGRFII

CLUSTAL O(1.2.2) -- Alinhamento Clones ShSHN1 - Variante C - 628 pb

SHSHN1.C.10-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.9-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.8-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.7-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.6-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.2-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.3-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.1-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.4-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.5-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG
SHSHN1.C.10-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.9-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.8-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.7-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.6-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.2-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.3-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.1-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.4-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA
SHSHN1.C.5-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCCTTCTA

SHSHN1.C.10-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.9-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.8-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.7-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.6-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.2-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.3-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.1-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.4-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
SHSHN1.C.5-628pb	TCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTGCTGATGAG
-	***************************************
SHSHN1.C.10-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.9-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.8-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.7-628pb	CGGCCGCAACACCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.6-628pb	CGGCCGCAACACCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.2-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.3-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.1-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.4-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC
SHSHN1.C.5-628pb	CGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAGCCTACCCC

SHSHN1 C 10-628pb	GCCTGCGGGAAGGGACGCTCGCCTGGCAGCCCCCTCTTACCCCCAACCTC
SHSHN1 C 9-628pb	
SHSHN1.C.9 020pb	
SHSHN1.C.0-020pb	
SHSHNI.C. /-626pb	
SHSHNI.C.6-628pb	
SHSHNI.C.Z=628pb	
SHSHNI.C.3-628pb	
SHSHNI.C.1-628pb	GGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTGTCCCCAGAT
SHSHN1.C.4-628pb	GGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTGTCCCAGAT
SHSHNI.C.5-628pb	GGUTGUGGGAAGGGAUGUTUGUGUTGGUAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTGTCCCAGAT ***********************************
SHSHN1.C.10-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACCTGTCTCCG
SHSHN1.C.9-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACCTGTCTCCG
SHSHN1.C.8-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCCTGACCTGTCTCCG
SHSHN1.C.7-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACCTGTCTCCG
SHSHN1.C.6-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCCTGACCTGTCTCCG
SHSHN1.C.2-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCCTGACCTCTCCCG
SHSHN1.C.3-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCCTGACCTGTCTCCCG
SHSHN1.C.1-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGCCGCCATCCCCGTCCCTGACCTCTCCCC
SHSHN1.C. 4-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGCCGCCATCCCCGTCCCTGACCTCTCCCC
SHSHN1.C.5-628pb	TCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGCCCCATCCCCGTCCCCTGACCTCTCCCC
5	***************************************

SHSHN1.C.10-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.9-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.8-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.7-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.6-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.2-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.3-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.1-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.4-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCCGTGCTGA
SHSHN1.C.5-628pb	CCTTGACCCTGAGAAGTCCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCCCCGTGCTGA
01011111010 02050	*****
SHSHN1.C.10-628pb	CTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGATGTTGCATC
SHSHN1.C.9-628pb	CTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGATGTTGCATC
SHSHN1.C.8-628pb	CTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAGGTGCAACATCCACTGATGTTGCATC
SHSHN1 C $7-628$ pb	CTCCAACTCGGTCATCACCGTGCAGCTCAACAAGCTGCAACATCCACTGCATGTTGCATC
SHSHN1 C 6-628pb	
SHSHNI.C.0 020pb	
SHSHNI.C.2 020pb	
CUCUNI C 1 C20pb	
SHSHNI.C.I-626pb	
SHSHNI.C.4-628pb	CTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGGTCCAACAAAGGTGCCAACATCCACTGATGTTGCATC
SHSHN1.C.5-628pb	CTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGATGTTGCATC

QUQUNI Q 10 (20-h	
SHSHN1.C.10-626pb	
SHSHNI.C.9-628pb	
SHSHN1.C.8-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
SHSHN1.C./-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
SHSHN1.C.6-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
SHSHN1.C.2-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAACCACCCCGATGGATG
SHSHN1.C.3-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAACCACCCCGATGGATG
SHSHN1.C.1-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
SHSHN1.C.4-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCGATGGATG
SHSHN1.C.5-628pb	ACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCGATGGATG

SHSHNI.C.IU-628pb	
SHSHNI.C.9-628pb	
SHSHN1.C.8-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C./-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C.6-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C.2-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C.3-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C.1-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C.4-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG
SHSHN1.C.5-628pb	CGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCATCGCATGG

SHSHN1.C.10-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.9-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.8-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.7-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.6-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.2-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.3-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.1-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.4-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
SHSHN1.C.5-628pb	AGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA
*	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequência de Aminoácidos - 5'3' Frame 1

MTENLHSRKMVQPKKFRGVRQRHWGSWVSEIRHPLL-GLLSLRDC-GGSESI-RGCRADE RPQRQDQLPSPKEQHRGAYPSCGKGRSRWQRLLYRQPVPDSQCEAPQMLQGAIAVPDLSP P-P-EVPHWCLAEARRSPC-LQLGHDRGAQQRCNIH-CCITVHISNNCSTSHPDG-RGED RPANDRRVAEQQQPSFTLAWR-PRSLHHL

CLUSTAL O(1	2.2)	 Alinhamento 	Variante	A	ShSHN1	х	Locus_	27034-Rnaseq	-	636	pb

Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG ATGACAGAGAATCTCCACTCCA
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGGTC *********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG *****************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG *****************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	CCTACCCCGGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG ********.
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCC TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCC *******************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	CGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT CATGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT *.***********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	GTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	GAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCC GAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCC *******************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.A-636pb	TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA ************************************

CLUSTAL O(1.2.2)	 Alinhamento	Variante	в	ShSHN1	х	Locus	27034-Rnaseq	-	642	pb

Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG ATGACAGAGAATCTCCACTCCA
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC **********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG *****************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG *****************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	CCTACCCCGGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCG ********
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC ******************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA *************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC *******************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	ACTGATGTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	GACGAGGAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCT GACGAGGAGGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCT ************************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.B-642pb	TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA ************************************

Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG ATGACAGAGAATCTCCACTCCA
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCT GTA AGGCC **********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TTCTATCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG ** *********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG *****************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	CCTACCCCGGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCCAACCTG *******
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC TCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCCCTGACC ***********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCC TGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCAGGAGCC *******************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	CGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT CGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCCACTGAT ***********************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	GTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGATG
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	GAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCC GAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCC *******************************
Locus_27034-Rnaseq shshn1.C-628pb	TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA *********************************

CLUSTAL	0(1.2.2)	 Alinhamento	Variante	С	ShSHN1	х	Locus	27034-Rnaseq	-	628	pb
							_	_			

CLUSTAL O(1.2.2) -- Alinhamento Variante A B e C ShSHN1 x Locus_27034-Rnaseq - 628 pb

shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	ATGACAGAGAATCTCCACTCCAGGAAAATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGG ATGACAGAGAATCTCCACTCCA
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCC CAGCGCCACTGGGGTTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTGTAAGGCC ******
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	TGGCTGGGCACCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TTCTATCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG TTCTATCCCTTCGAGACTGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGACGAGGCTGCCGTG ** *********************************
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAAGGGGAG CTGATGAGCGGCCGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAGTCCAAAGGAGCAGCACAGGGGAG *******
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCAGCAACACTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCCGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC CCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCTCGCGCTGGCAGCGGCTCCTCTACCGCC *********************************
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC AACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCGCCGTCC ******************************
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA CTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGTGTTTGGCAGAAGCGCGCA *************************
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC GGAGCCCGTGCTGACTCCAACTGGGTCATGACCGTGGAGCTCAACAAAGGTGCAACATCC *******************************
shshnl.B-642pb shshnl.A-636pb shshnl.C-628pb	ACTGATGTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ACTGATGTTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACTGCTCCACCAGCCACCCCGATGGAT ******
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	GACGAGGAGAGGATCGCCCTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCT GACGAGGAGAGGA
shshn1.B-642pb shshn1.A-636pb shshn1.C-628pb	TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA TCACCCTCGCATGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGA ************************************

9 - Manuscrito

Ē
OVEREXPRESSION OF SUGARCANE TRANSCRIPTION FACTOR ShSHN1 IN RICE NEGATIVELY IMPACTS ON LIGNIN CONTENT IMPROVING SACCHARIFICATION EFFICIENCY

Boer, A.P.M^{1,2}, Brito, M.S¹, Goldman, M.H.S², Mazzafera, P³, Takahashi, N¹, Portilla, J.P.L³, Nobile, P.M¹, and Creste, S¹

¹Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto, SP – Brazil

²Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - SP – Brazil ³Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP – Brazil

ABSTRACT

The major obstacle for biofuel production from plant biomass is the low saccharification efficiency caused by cell wall recalcitrance. This saccharification efficiency is negatively correlated with lignin content present in plant tissues. In this study, the transcription factor ShSHN1 was cloned from sugarcane and was overexpressed in rice - a monocot plant model - in order to evaluate their potential for the development of refined lignocellulosic feedstocks that can be use in biofuels production. The analysis included qPCR gene expression of lignin related genes in transgenic ShSHN1 lines and, complementary, we also performed analysis of lignin content dosage and determination of saccharification efficiency process. It has been shown that overexpression of ShSHN1 led to decrease in the expression of all genes of lignin metabolism, indicating a possible relationship between this TF and the regulatory mechanisms of lignin pathway. Furthermore, ShSHN1 ectopic overexpression resulted in a reduction in lignin content and increased saccharification efficiency from residues of cell wall in transgenic lines. The reduction of in lignin content improve in saccharification efficiency, shows the great potential of TF ShSHN1 to develop improved feedstocks to be used in the production of lignocellulosic ethanol.

INTRODUCTION

The search for renewable fuels, in contrast to the use of fossil fuels, has become an increasing challenge for countries that fetch green energy sustainability. The continuous global demand for energy, coupled with the high dependence on oil, and the attempt to minimize negative effects of greenhouse gases concentration in the atmosphere, driving interest and the global demand for biofuels. Plant cell walls correspond to the most abundant resource of renewable energy on earth (Ahuja et al., 2014). It is estimated that the liquid CO2 fixation by terrestrial plants each year is about 50x109 tons and biomass exceed 180x109 tons (Field et al., 1998). All cell walls of higher plants contain cellulose, the most abundant biopolymer present in nature (Stokes et al., 2001). It plays a key role in organizing the plant cell wall and about 50% of the plant biomass is composed by this biomolecule (Cosgrove, 2005). It is a long chain polysaccharide composed of subunits (monomers) of glucose (Cosgrove, 2005), which can be converted into fermentable sugars (in a process known as saccharification) for obtaining biofuels such as lignocellulosic ethanol (2G ethanol). (Chandel et al., 2012). However, cellulose available in the cell wall is trapped in a matrix of hemicellulose and lignin, known as lignocellulosic biomass. The presence of lignin impacts negatively on the solubilization and enzymatic processes for the production and fermentation of these sugars, impairing the efficiency for this biofuel production (Chen and Dixon, 2007; Weng et al., 2008; Cheavegatti-Gianotto et al., 2011; Ookawa et al., 2014). Lignin is synthesized from the phenylpropanoid pathway, starting with the phenylalanine amino acid deamination to form cinnamic acid, followed by a series of circular hydroxylation, O-methylation and other modifications (Yoon et al., 2015). The enzymes involved in the biosynthesis of monolignols are phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), 4-coumarate: CoA ligase (4CL), coumarate 3-hydroxylase (C3'H), (hydroxy) cinnamoyl CoA reductase (CCR), ferulate 5-hydroxylase (F5H), caffeic acid O-methyl transferase (COMT) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (Boerjam and Baucher, 2003). Many transcription factors (TFs) are responsible for coordinating the expression of these lignin biosynthesis genes during the development of plant cell walls (Zhong et al., 2006; Zhong and Ye, 2009a, 2014b). The first hierarchical level in the modulation of all gene expression network is represented by the action of some TFs belonging to NAC family (NAM - No Apical Meristem, ATAF, CUC - CUP/SHAPED Cotyledon). Among them, three sNAC members are currently defined as master regulators in the formation of lignin in different plant tissues: NST1 and NST2 (NAC SECONDARY WALL THICKENING

PROMOTING FACTORS) in anthers, NST3/SND1 (SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN) in fibers, and VND (VASCULAR-RELATAD NAC DOMAIN) in vessels. These TFs activate downstream TFs, belong to MYB class, also considered as a masterswitches. These intermediate TFs, in turn, activate other MYBs that bind directly to the lignin biosynthetic genes, achieving high levels of specificity, being considered as the third level of gene expression regulation. This network of TFs also pinpoints to the possibility of the existence of multiple knobs and switches that can be tuned to execute specific regulation of different lignin genes in order to optimize de deposition of this biomolecule during secondary cell wall development (Ambavaram et al., 2011). Despite this conserved model have been seen in different plants, another TF has been highlighted as a possible regulator of plant secondary wall biosynthesis. Classically, TFs members of the SHN clade "SHINE / WAX INDUCER " (SHN / WIN) are described as a group that regulates wax and cutin pathways in epidermal cells of several species such as arabdopsis (Aharoni et al., 2004a, 2011b; Kannangara et al., 2007; Yan et al., 2011; Xu et al., 2016), tomato (Shi et al., 2012; Hasan et al., 2014; Levy et al., 2014), apple (Lashbrooke et al., 2015), barley (Taketa et al., 2008) and rice (Wang et al., 2012), conferring resistance to abiotic (drought) and biotic stresses (pathogen attack). However, recent studies of overexpression of AtSHN2 in rice (Oryza sativa) revealed a possible function as a central regulator of lignin and other cell wall biosynthetic genes (Ambavaram et al., 2011). These recent findings suggest the potential application of these TFs as target genes that can be exploited to improve biomass feedstocks that can be used for conversion into biofuels. To this end, we have identified and cloned the homologous of AtSHN2 of sugarcane (ShSHN1), which was subsequently over expressed in rice to evaluate possible effects on the deposition of lignin in the transgenic plants. Furthermore, analyzes in the efficiency of saccharification process were conducted in order to check for differences between WT and ShSHN1 lines. In a further perspective, the knowledge here obtained will be useful for the development of improved feedstocks that can be used in the production of 2G ethanol.

METHODOLOGY

Plant Materials

Stem samples were collected from six months old sugarcane (Saccharum spp. hybrids) genotype IACSP04-065 cultivated at greenhouse under natural conditions. Samples of the fifth and sixth internodes corresponding to intermediary mature stage (Brito et al., 2015) were collected, immediately frozen in liquid N2, and stored at -80. The rice (Oryza sativa) variety used for the genetic transformation experiments was cv. Nippombare.

Bioinformatics Analysis and Identification of SHINE (SHN) Sequence in Sugarcane

As a starting point for the characterization and subsequent cloning of the coding region of FT ShSHN1, in silico search was performed using the tBLASTx tool against SUCEST database (Sugarcane EST's / ssucest-fun.org). SHN sequences from Arabidopsis (Aharoni et al, 2004) and rice (Ambavaram et al, 2011) were used as reference (bait) for identifying candidate sequences of sugarcane (SAS). In addition, a complementary search in a database deriving from an RNA-seq experiment (Vicentini et al., 2015) for two sugarcane varieties contrasting for lignin content (IACSP04-065 and IACSP04-627), were performed and allowed the identification of SHN homologue sequence in sugarcane that was named ShSHN1 (Brito et al., 2015). Alignment and phylogeny analyses between the SHN amino acid sequences described in the literature, and among homologous genomic sequences SHN from a search in data banks of corn, sorghum and rice (www.phytozome.net) were conducted. The construction of the dendrogram was performed using the statistical method of maximum likelihood, with bootstrap = 300. The ClustalX program (www.clustal.org) was used in aligning the sequences and the MEGA 5.1 program (www.megasoftware.net) was used for construction and display of the phylogenetic tree.

Cloning of ShSHN1 Gene and Overexpression Vector Construction

The full-length cDNA of SHN sugarcane gene (ShSHN1) was amplified by RT-PCR from stem tissue of the cultivar IACSP04-065 using the specific primers ShSHN1-F ATGACAGAGAATCTCCACTCC and ShSHN1-R CAAGGTCGCTTCAT-CATCTGA. The sequence-confirmed PCR product was used for the construction of an overexpression vector using the Gateway Recombination SystemTM following the manufacturer's instructions. Through multiple recombination reactions using pEN-L4-UBIL-R1 and pHb7m24GW plasmids, the final expression cassette (Fig. 3.a) was built containing the ShSHN1 sequence fused to maize ubiquitin promoter (Ubi1) and a T-35S terminator. As a marker plant selection, the hpt gene - which confers resistance to the antibiotic hygromycin - was fused to the promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV35S) and a T-nos terminator. The vector was named pOEShSHN1.

Generation and Confirmation of Transgenic ShSHN1 Rice Lines

The pOEShSHN1 vector was introduced into Agrobacterium tumefaciens strain EHA-105 via electroporation (Mattanovich, 1989). For genetic transformation of rice, embriogenic calli were pre induced by culturing sterile mature seeds on N6D medium, and the experiments were conducted following the methodology proposed by Toki et al. (2006). The total DNA of transformed and non-transformed plants were isolated and purified from in vitro seedlings using a protocol developed by Al Janabi et al., 1999. The primers Ub1-F GATGCTCACCCTGTTGTTTG and 35S-R GCAGGTCACCTGGATTTTGCT were used in PCR reactions carried out in a 2720 Thermocycler (Applied Biosystems) to confirm the presence of T-DNA on transgenic events. Transgene copy number was evaluated by TaqMan real-time PCR as described by Mason et al., 2002.

Gene Expression Analysis

Total RNA from sugarcane stem samples and also from leaves and tillers of transgenic and non-transgenic rice plants were isolated using the extraction methodology by Trizol following the protocol developed by Rio et al. (2010). RNA was quantified at 260 and 280nm by NanoDrop 2000 Spectrophotometer and the integrity was estimated by electrophoresis in 1% agarose gel, under 254 nm UV light. The total RNA samples were treated with DNase (RQ1 DNAse - Promega) for approximately one hour to remove any traces of genomic DNA. For subsequent cDNA synthesis, the commercial Kit Improm II-Reverse Transcription System (Promega) was used under the manufacturer's recommendations. For each sample, lug of total RNA was used for the conversion into cDNA. The qPCR reactions were carried out using a commercial GoTaq qPCR Master Mix (Promega) in a thermocycler Step One Plus (Applied Biosystems) according to the manufacturer recommendations. The qPCR efficiencies of all primers used in this study (¿90% ; ¡110%) were estimated with LinReg Software (Ramakers et al., 2003). For expression analysis of ShSHN1 were used the same primers designed by Brito et al., 2015. For transgenic rice lines analysis, specific primers for genes related to the biosynthesis of lignin were designed and are shown in Table 1. The housekeeping gene eEF1a was used in qPCR experiments and previously validated as a good reference gene in rice by Jain et al. (2006). For transgenic rice analysis, three independent biological replicates of each event and three technical replicates of each biological samples were used for the experiments of expression by qPCR. The data generated were analyzed using the software Real Time PCR Software Tool (Applied) and the relative amount of target molecules was calculated from the 2delta CT method (Livak and Schmittgen, 2001). For all analyzes, were used three different plants from each of the four independent lines selected, besides the wild type. Statistical analyzes were performed by comparing the average of transgenic samples and the control group (wild type) using the Relative Expression Software Tool - REST - (Pfaffl, 2002).

Lignin Quantification

Lignin quantification was conducted using Klason method according to protocol proposed by Hatfield and Fukushima (2005) with some modifications. Plant material from tillers were macerated in liquid N2 to obtain an ultrafine powder and subsequently lyophilized. The ground tissue was washed with 100 ml of acetone for 8 hours and after complete evaporation, 200 mg of each sample was mixed with 3 mL of H2SO4 (72%). Samples were kept in a water bath for 2 hours at 20 C. The content was transferred into 150 mL tube and added 112 mL of ultrapure water. The tubes were sealed and autoclaved (120 C/60 min). Later, samples were cooled at room temperature and vacuum filtered. Finally, the acid insoluble lignin content was determined gravimetrically and Klason lignin was expressed as percentage of dry cell wall residues.

Determination of Saccharification Efficiency

Saccharification efficiency determination was conducted according to the method described by Brown and Torget (1996). Plant material previously macerated and lyophilized - also free of soluble sugars and starch - were weighed in Eppendorf tubes of 1.5 mL. The equivalent of 10 mg of cellulose was used. For each sample it was added 500 uL of sodium citrate buffer (0.1M, pH4.8), 10 ul of sodium azide, with the volume made up to 1 ml with ultrapure water. The mixture was heated to 50 C, with subsequent addition of 6 uL of a mix containing (1:4, v/v) of cellulase (1,2 FPU / cellulose 10 mg) and cellobiose (1.26 U pNPGU / 10mg cellulose). Tubes containing the samples and the reaction solution were sealed and mixed at 160 rpm at 50 C for 5 days. After that, samples were centrifuged at (12.000 rpm / 15 min) and the supernatant was recovered. Determination of glucose was taken by sulfuric phenol method (DuBois et al., 1956).

 Table 1 - List of primers used in qPCR experiments. Name, locus, and their corresponding sequences and references are show.

Gene	Locus	Sequence 5' - 3'	Name	Reference
Sh SHN1	Sh27034	F - ATGACAGAGAATCTCCACTCC R - CAAGGTCGCTTCATCATCTGA	Sugarcane SHN1	Vicentini et al., 2015
OseEF1a1	Os03g08020	F - TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT R - GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA	Elongation factor 1 alpha	Jain et al., 2006
OsPAL1	Os12g33610	F - CACAACCAGAGCGTCAACT R - CAGTGCGATGAGGAAAGTAGAG	Phenylalanine ammonia-lyase 1	Liu et al., 2015
OsCOMT1	Os08g06100	F - GTGGGTAATCATGTCGTTTGC R - AGCAGACAGGTTACATCCATTAG	Caffeic Acid O- Methyltransferase 1	Fengqiu et al., 2006
OsC4H2	Os01g60450	F - CGCCTCGTCCAGAACTT R - CTAGAACGCTCTCGGCTT	Cinnamate-4- Hydroxylase 2	Liu et al., 2015
OsCCR1	Os09g08720	F - AAGAGAGGCTCTGTCTGAACTA R - AGGTGAGGCAACATGGAATAC	Cinnamoyl CoA reductase 1	Liu et al., 2015
OsCAD2	Os02g26770	F - GGCAGCAACATCGACGAC R - CGTCAGAGTCTCACACAACAA	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase 2	Hirano et al., 2012
Os4CL3	Os02g08100	F - AGATATGATGTTGCTGTCCATGA R - AGCAGCATCAACCAACCA	4-coumarate-CoA ligase 3	Liu et al., 2015
OsC3H	Os05g41440	F - CTGCTGCTGCTGGTTATACA R - CACAAGGCAATTAACACCTCAAA	Coumarate 3- hydroxylase	Liu et al., 2015
OsHCT	Os04g42250	F - GCTATGCTCTTGCTCCTGTT R - GCTCATTATTGGTTGCTCACATC	Hydroxycinnamoyl- shikimate/quinate transferase	Liu et al., 2015
OsF5H3	Os10g3684	F - AGGGTATAATTAAGGGTGACAGTG R - TCAGAGGCTGTGCTTATGTG	Ferulate 5- hydroxylase 3	Liu et al., 2015
OsNST1/2	Os08g02300	F - ACAGAGACAAGACAAGTAAGAA R - ATGGTGGATCTCTCTCTCTCTC	NAC Secondary Wall Thickening Factor 1/2	Ambavaram et al., 2011

RESULTS

Bioinformatics Analysis and Characterization of ShSHN1 Sequence

The alignment and the construct of the phylogenetic tree using the ShSHN1 amino acid sequence showed that ShSHN1 belong to SHN clade (Fig. 2), which is characterized by the AP2 domain and the complete protein motifs 'mm' and 'cm' (Aharoni et al., 2004) (Fig. 1). In public databases searches were identified two SHN members in monocots such as corn (ZmEREB46, ZmEREB145), sorghum (Sb10g023600, Sb04g006970) and rice (Os02g10760, Os06g40150), while three SHN members were identified in dicots such as Arabidopsis (AtSHN1, AtSHN2, AtSHN3) and tomato (SISHN1, SISHN2, SISHN3). Furthermore, it was possible to identify the putative orthologs of ShSHN1 which are grouped in the same subgroup, such as corn (ZmEREB46), sorghum (Sb04g006970) and rice (Os02g10760) (Fig. 2).



Figure 1. Multiple alignment of related SHN amino acids sequences using ClustalX software. Arabdopsis (At), tomato (Sl), barley (Hv), maize (Zm), sorghum (Sb), rice (Os) and sugarcane (Sh). Arrows indicate conserved regions of the AP2 domain and 'mm' and 'cm' motifs that are exclusive to the SHINE clade.



Figure 2. Phylogenetic Analysis. Phylogenetic tree was generated using TFs sequences belonging to the AP2 family in arabidopsis (At), tomato (Ps), maize (Zm), sorghum (Sb), barley (Hv), rice (Os), and sugarcane (Sh). The tree was generated using amino acid sequences and analyzed with ClustalX software and visualized in the MEGA 5.1 software. Maximum Likelihood Method (bootstrap = 300).

Production of Transgenic Rice Lines with ShSHN1 Overexpression Construct

To design the final overexpression vector containing the ShSHN1 sequence was used the Gateway Recombination System (Walhout et al., 2008). The full-length cDNA of TF ShSHN1 was cloned in a reaction tube containing the standard plasmid pDONR 221 (BP reaction) thereby generating an entry clone compatible with any GatewayTM expression vectors. Subsequently, the entry clone was recombined (LR reactions) into a final vector (pOEShSHN1) allowing the overexpression of ShSHN1 sequence. The maize ubiquitin promoter (Ubi1) was placed upstream of the fragment of ShSHN1 and the selectable marker hpt (hygromicin phosphotransferase) was placed under control of the CaMV35S promoter (Fig. 3a). Rice embryogenic calli of Nipponbare cultivar were infected with EHA-105 Agrobacterium strain carrying the pOEShSHN1 vector and resistant explants were obtained after hygromicin selection. Ten independent transgenic rice plants were obtained in T0 and later confirmed as positive transformants by PCR using Ubi1-F and 35S-R primers. A representative gel is show in Fig. 3.b. After 30 days of culture in selective hygromicin medium, complete regenerated plants were obtained and grown to maturity in greenhouse to obtain T1 seeds (Fig. 3.c). T0 analysis of transgene expression levels of ShSHN1 in all of the ten independent transgenic rice plants revealed different levels of transgene expression (Fig. 4.a). Three events (T19A, T20A and T16A) showed high levels of transgene expression while five events exhibited moderate levels of expression (T11A, T15A, T3A, T27A and T6A) and two events showed low expression levels (T4A and T13A). TaqMan analysis was used for determination of copy numbers. Nine of them had only one copy of transgene inserted on genome and the remaining event (T16A) had four copies (Fig. 4.b). The three transgenic events that exhibited highest expression levels and a single copy of transgene insertion (T6A, 19A and 20A) were used for germination of T1 progeny to perform qPCR expression analysis, lignin amount and saccharification efficiency.



Figure 3. Expression cassette, PCR confirmation, and greenhouse cultivation of ShSHN1 lines. A: Schematic representation of ShSHN1 and hygromycin (hpt) expression cassettes in the T-DNA of pOEShSHN1 vector. B: PCR product amplification of ShSHN1 sequence in ten transformed rice lines using Ubi1-F and 35S-R primers. C: T0 transgenic rice lines growing in greenhouse.



Figure 4. Transcript level analysis and transgene copy number of ShSHN1 in transgenic events. A: Relative T0 expression of ShSHN1 in transgenic rice events showing different levels of expression. B: Transgenic copy number obtained by TaqMan assay.

Gene Expression Profile of Lignin Related Genes in ShSHN1 Lines

To evaluate the effect of overexpression of ShSHN1 in transgenic rice lines a series of qPCR experiments were conducted in order to determine the amount and tissue specificity of some lignin biosynthetic genes (Fig. 5). For that, it was used samples of leaf and tillers of transgenic and wild type plants from T1 generation. Data analysis showed that the transcriptional levels of all lignin related genes analyzed were significantly repressed both in leaf and tiller tissues. Furthermore, the expression of a master regulator related to lignin metabolism (NST1/2) was also repressed in these tissues.



Figure 5. Expression profile of lignin biosynthetic genes. Relative gene expression of lignin genes and transcriptional regulators assessed through qPCR in leaves and tillers tissues compared with the wild type (WT). Data are represented as the average of transcript levels in ShSHN1 transgenic lines compared to wild type for each type of tissue [leaf (light gray) and tiller (dark gray)]. The bars show the standard deviation and the asterisks indicate levels of significance of differential expression (REST, P 0.05).

Lignin Content and Saccharification Efficiency in ShSHN1 Lines

The dosage of lignin by Klason method shows that all transgenic lines had lower lignin content than wild type plants. With a significant difference of 50% in total lignin content, the line 20A exhibited the highest reduction level followed by line 19A (Fig. 6.a). Complementary, saccharification rates showed statistically significant increase of sugar release around 25% in line 19A, and 50% in 20A when compared to WT (Fig.6.b).



Figure 6. Biochemical analysis of SHN transgenic lines. Lignin content (A) and saccharification efficiency (B) of ShSHN1 lines and wild type (WT). Vertical bars indicate the standard error of the mean independent triplicates and the asterisks indicate the significance level (ANOVA, Tukey. * P 0.05).

DISCUSSION

Lignin is involved in diverse biological processes in plants and its proper deposition in different types of specialized cells is essential for the development and plant growth. However, the presence of lignin hamper the solubilization, enzymatic break processes (saccharification) and fermentation of cell wall sugars constituents, compromising the efficiency of conversion of biomass to biofuels such as 2G ethanol (Chen and Dixon, 2007; Cheavegatti- Gianotto et al., 2011). Corroborating previously data obtained by Aharoni et al. (2004) and Brito et al. (2015), the alignment and the construct of the phylogenetic tree using the ShSHN1 amino acid sequence showed that it is grouped with members of SHN clade, which is formed by SHN sequences previously characterized in the literature such as AtSHN1-3 (Aharoni et al., 2004), SISHN1-3 (Shi et al., 2012) OsSHN (Trijatmiko, 2005) and HvNUD (Taketa et al., 2008) (Fig. 2). The overexpression of TF ShSHN1 in rice transgenic lines led to a reduction of the expression levels of all analyzed genes involved in lignin biosynthesis (OsPAL1, OsC4H2, Os4CL3, OsHCT, OsC3H, OsCCR1, OsF5H3, OsCOMT1 and OsCAD2). Furthermore, the transcription factor OsNST1/2, whose homologs in arabdopsis, maize and rice (Zhong et al., 2006.a, 2011.b) acts as the master regulator in the expression of some TFs relatated to lignin pathway such as MYB46, MYB83 and MYB103 (Zhong et al. 2007; Ko et al. 2009; McCarthy et al. 2009), also showed reduced expression levels (Fig. 5). These results corroborate previously data obtained by Ambavaram et al. (2011), which showed that overexpression of AtSHN2 (homologous to ShSHN1) in rice, leads to a reduction in the expression levels of CAD and 4CL family genes, besides some TFs such as NST1/2 and MYB58/63, suggesting that overexpression of ShSHN1 acts in the negative regulation of lignin pathway. In general, modification in the expression pattern of genes that participate in biosynthetic pathway of monolignols (i.e. PAL, C4H, CL4, HCT and C3H) change the amount of lignin deposited in the plant cell wall. By the other side, changes in the composition of the monomers S and G are primarily related to the activity of F5H and COMT enzymes (Gallego-Giraldo et al., 2011; Voelker et al., 2011; Yoon and An, 2015). Down regulation of genes involved with lignin biosynthesis such as PAL family gene (Elkind et al., 1996; Song and Wang, 2011) C4H (Bell-Lelong et al., 1997; Schilmiller et al., 2009), 4CL (Yan et al., 2015; Gui et al., 2011), HCT and C3H (Franke et al., 2002; Yunqiao et al., 2009) resulting in plants with reduction of vegetative growth, abnormal development of vascular tissues, poor leaf formation - with consequent impairment of photosynthesis and plant development (dwarf) - beyond sterility. In our results, it was found that despite the low levels of expression of OsPAL1, OsC4H, OsCL43, OsHCT and OsC3H genes in both tillers and leaves of transgenic ShSHN1 lines, it was not observed any negative aspects in plant growth, development of floral organs or even seed production (data not show). Furthermore, although the expression of OsC4H2 was drastically reduced in leaf tissue of ShSHN1 line 20A (Fig. 5) it was not detected any impact in leaf development. Moderate reduction pattern observed in the expression levels of the lignin

genes evaluated, rather than a drastic reduction or complete silencing a particular gene, might have allowed the appropriate development of ShSHN1 lines, without pleiotropic effects. Another aspect observed was the proportional relationship between the levels of ShSHN1 expression and the reduction in lignin content in transgenic lines (Fig. 4.a and Fig. 6.a). These results were consistent with the low expression levels obtained for the lignin biosynthetic genes assessed by qPCR (Fig. 5). Decrease in expression levels of lignin biosynthetic genes has led to a reduction in the average content of lignin in ShSHN1 lines, with a significant reduction by 50% when compared to WT. Coherently with these results, the saccharification efficiency showed an increase of about 25-50% in ShSHN1 lines when compared to WT (Fig. 6.b), suggesting that the decrease in lignin content of transgenic lines may have contributed to the observed increase in saccharification rates. These results are higher to those obtained by the suppression of lignin biosynthesis genes such as COMT in sugarcane (20-35%) and switgrass (20%) (Altpeter et al., 2012a, 2013b; Fu et al., 2010). Similarly, suppression of another lignin pathway gene (CAD) in switchgrass led to a considerable increase up to 35% of the saccharification efficiency (Fu et al., 2011), but still lower than those obtained in ShSHN1 lines. On the other hand, the suppression by RNAi in 4CL gene of sugarcane led to slightly higher on saccharification efficiencies than described herein (50-70%) (Jung et al., 2016). Besides that, the repression of both CAD and 4CL family genes by overexpression of AtSHN2 in rice also lead to a higher efficiency in sugar release (Ambavaram et al., 2011). In conclusion, the overall reduction in the expression levels of lignin biosynthetic genes observed by overexpression of TF ShSHN1 in rice, beyond the reduction in lignin content (up to 40%) and improve up to 50% in saccharification efficiency of ShSHN1 lines, demonstrates the great potential of the FT ShSHN1 for engineering bioenergy crops. These findings can be applied for the development of improved feedstocks which can be used in biofuels production such as 2G ethanol.

REFERENCES

Aharoni, A., S. Dixit, et al. (2004). "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 16(9): 2463-2480.

Altpeter, F. and H. Oraby (2010). Sugarcane. Genetic Modification of Plants: Agriculture, Horticulture and Forestry. F. Kempken and C. Jung. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 453-472.

Ambavaram, M. M. R., A. Krishnan, et al. (2011). "Coordinated Activation of Cellulose and Repression of Lignin Biosynthesis Pathways in Rice." Plant Physiology 155(2): 916-931.

Bell-Lelong, D. A., J. C. Cusumano, et al. (1997). "Cinnamate-4-Hydroxylase Expression in Arabidopsis (Regulation in Response to Development and the Environment)." Plant Physiology 113(3): 729-738.

Brown, L. and R. Torget (1996). "Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass." Laboratory analytical procedure 9.

Chandel, A. K., S. S. da Silva, et al. (2012). "Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bioproducts." Journal of Chemical Technology and Biotechnology 87(1): 11-20.

Cheavegatti-Gianotto, A., H. M. de Abreu, et al. (2011). "Sugarcane (Saccharum X officinarum): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil." Trop Plant Biol 4(1): 62-89.

Chen, F. and R. A. Dixon (2007). "Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production." Nat Biotechnol 25(7): 759-761.

Cosgrove, D. J. (2005). "Growth of the plant cell wall." Nat Rev Mol Cell Biol 6(11): 850-861.

Elkind, Y., R. Edwards, et al. (1990). "Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene." Proceedings of the National Academy of Sciences 87(22): 9057-9061.

Field, C. B., M. J. Behrenfeld, et al. (1998). "Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components." Science 281(5374): 237-240.

Fu, C., X. Xiao, et al. (2011). "Downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) leads to improved saccharification efficiency in switchgrass." BioEnergy Research 4(3): 153-164.

Gallego-Giraldo, L., L. Escamilla-Trevino, et al. (2011). "Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants." Proceedings of the National Academy of Sciences 108(51): 20814-20819.

Hatfield, R. and R. S. Fukushima (2005). "Can lignin be accurately measured?" Crop science 45(3): 832-839.

Hirano, K., M. Kondo, et al. (2013). "Identification of Transcription Factors Involved in Rice Secondary Cell Wall Formation." Plant and Cell Physiology 54(11): 1791-1802.

Jain, M., A. Nijhawan, et al. (2006). "Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR." Biochemical and Biophysical Research Communications 345(2): 646-651.

Jung, J. H., B. Kannan, et al. (2016). "Precision breeding for RNAi suppression of a major 4-coumarate: coenzyme A ligase gene improves cell wall saccharification from field grown sugarcane." Plant Molecular Biology: 1-13.

Jung, J. H., W. M. Fouad, et al. (2012). "RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass." Plant Biotechnology Journal 10(9): 1067-1076.

Jung, J. H., W. Vermerris, et al. (2013). "RNA interference suppression of lignin biosynthesis increases fermentable sugar yields for biofuel production from field-grown sugarcane." Plant Biotechnology Journal 11(6): 709-716.

Kannangara, R., C. Branigan, et al. (2007). "The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in Arabidopsis thaliana." The Plant Cell 19(4): 1278-1294.

Lashbrooke, J., A. Aharoni, et al. (2015). "Genome investigation suggests MdSHN3, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development." Journal of Experimental Botany.

Liu, Q., L. Zheng, et al. (2015). "Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots." Plant and Soil 387(1-2): 323-336.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 CT Method." Methods 25(4): 402-408.

McCarthy, R. L., R. Zhong, et al. (2009). "MYB83 Is a Direct Target of SND1 and Acts Redundantly with MYB46 in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis." Plant and Cell Physiology 50(11): 1950-1964.

Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Research 30(9): e36.

Ramakers, C., J. M. Ruijter, et al. (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." Neuroscience Letters 339(1): 62-66. Santos Brito, M., P. M. Nobile, et al. (2015).

"Expression Profile of Sugarcane Transcription Factor Genes Involved in Lignin Biosynthesis." Tropical Plant Biology 8(1): 19-30.

Schilmiller, A. L., J. Stout, et al. (2009). "Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis." The Plant Journal 60(5): 771-782.

Shi, J. X., A. Adato, et al. (2013). "The tomato SISHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning." New Phytologist 197(2): 468-480.

Song, J. and Z. Wang (2009). "Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase

gene (SmPAL1) from Salvia miltiorrhiza." Molecular biology reports 36(5): 939-952.

Taketa, S., S. Amano, et al. (2008). "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 105(10): 4062-4067.

Trijatmiko, K. R., G. van Arkel, et al. (2005). "Expression of the Arabidopsis SHINE gene in rice for drought resistance." COMPARATIVE ANALYSIS OF DROUGHT RESISTANCE GENES IN ARABIDOPSIS AND RICE: 67.

Vicentini, R., A. Bottcher, et al. (2015). "Large-Scale Transcriptome Analysis of Two Sugarcane Genotypes Contrasting for Lignin Content." PLoS ONE 10(8): e0134909.

Voelker, S. L., B. Lachenbruch, et al. (2011). "Reduced wood stiffness and strength, and altered stem form, in young antisense 4CL transgenic poplars with reduced lignin contents." New Phytologist 189(4): 1096-1109.

Wang, Y., L. Wan, et al. (2012). "An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice." Plant Molecular Biology 78(3): 275-288.

Xu, Y., H. Wu, et al. (2016). "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 17(4): 587.

Yan, L., C. Xu, et al. (2013). "The heterologous expression in Arabidopsis thaliana of sorghum transcription factor SbbHLH1 downregulates lignin synthesis." Journal of Experimental Botany 64(10): 3021-3032.

Yan, L., C. Xu, et al. (2013). "The heterologous expression in Arabidopsis thaliana of sorghum transcription factor SbbHLH1 downregulates lignin synthesis." Journal of Experimental Botany 64(10): 3021-3032.

Yoon, J., H. Choi, et al. (2015). "Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development." Journal of Integrative Plant Biology 57(11): 902-912.

Zhong, R., C. Lee, et al. (2008). "A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis." The Plant Cell 20(10): 2763-2782.

Zhong, R., C. Lee, et al. (2011). "Transcriptional Activation of Secondary Wall Biosynthesis by Rice and Maize NAC and MYB Transcription Factors." Plant and Cell Physiology 52(10): 1856-1871.

Zhong, R., Y. Yuan, et al. (2015). "Functional Characterization of NAC and MYB Transcription Factors Involved in Regulation of Biomass Production in Switchgrass Panicum virgatum." PLoS ONE 10(8): e0134611.